

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CATIANE POMPILIO BRESCANSIN

**PROSPECÇÃO PROTEÔMICA DE BIOMARCADORES
ERITROCITÁRIOS ASSOCIADOS AO *DIABETES MELLITUS***



CURITIBA
2017

CATIANE POMPILO BRESCANSIN

**PROSPECÇÃO PROTEÔMICA DE BIOMARCADORES ERITROCITÁRIOS
ASSOCIADOS AO *DIABETES MELLITUS***

Dissertação apresentada Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profª Drª. Dayane Alberton.
Coorientador: Prof Dr. Geraldo Picheth.

CURITIBA

2017

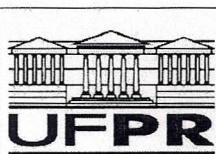
Brescansin, Catiane Pompilio
Prospecção proteômica de biomarcadores eritrocitários associados ao *Diabetes mellitus* / Catiane Pompilio Brescansin – Curitiba, 2017.
98 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Dayane Alberton
Coorientador: Professor Dr. Geraldo Picheth
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Diabetes mellitus*. 2. Proteoma. 3. Eritrócitos. 4. Biomarcadores. I. Alberton, Dayane. II. Picheth, Geraldo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.462



TERMO DE APROVAÇÃO

CATIANE POMPILIO BRESCANSIN

Título: "Prospecção proteômica de biomarcadores eritrocitários associados ao Diabetes mellitus"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.

Profª. Drª. Dayane Alberton
Orientadora

Profª. Drª. Mauren Isfer Anghebem-Oliveira
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 06 de abril de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais, Aparecida Pompilio Brescansin e Mario Brescansin Filho, que sempre me incentivaram a estudar e a me dedicar. Dedico aos meus filhos, João Victor Brescansin Nunes, Miguel Brescansin Nunes e Sara Brescansin Nunes, que o simples fato deles existirem me traz inspiração.

AGRADECIMENTOS

Quando penso em agradecimentos, penso primeiramente em agradecer a Deus. Agradeço a Ele por ter guiado os meus caminhos até aqui.

Agradeço aos professores do laboratório de Bioquímica Clínica, em especial a prof^a. Dr^a. Dayane Alberton por ter aceitado a ser a minha orientadora, aos professores Dr. Geraldo Picheth e Dr^a. Fabiane Gomes de Moraes Rego, por terem me acolhido e assistido ao desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná, como a pós-graduação de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade. Agradeço em especial o professor Dr. Roberto Pontarollo por ter sido grande incentivador para o meu ingresso ao programa de pós-graduação.

Agradeço a prof^a. Dr^a. Lucélia Donatti, do programa de pós-graduação de Biologia Celular e Molecular, por ter ajudado a desenvolver o trabalho na parte da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório que ajudaram-me nesse crescimento acadêmico.

Agradeço a minha família, tanto a de origem, pais e irmãos, quanto a que formei com meu marido e meus filhos, pelo apoio no decorrer desses anos.

RESUMO

O *Diabetes mellitus* (DM) é caracterizado por um quadro hiperglicêmico decorrente da deficiência na síntese, na ação da insulina, ou ambos. O diagnóstico precoce do diabetes, atrelado ao adequado tratamento e monitoramento, permite minimizar e postergar o aparecimento das complicações associadas (nefropatia, retinopatia, doença cardiovascular, entre outras), melhorando a qualidade de vida dos afetados e reduzindo os custos do sistema de saúde pública. Atualmente, os critérios diagnósticos para o diabetes ainda são baseados na glicemia em jejum, teste oral de tolerância a glicose ou dosagem de hemoglobina glicada. Considerando a complexidade e as complicações da doença e que o diagnóstico é realizado apenas na medição de glicose e na dosagem de hemoglobina glicada, é de extrema importância que novos biomarcadores confiáveis para o diagnóstico, tratamento e prognóstico da patologia sejam pesquisados. Portanto, o objetivo do trabalho foi a detecção e identificação de proteínas de membrana e do citoplasma de eritrócitos de pacientes com DM do tipo 1, DM do tipo 2 com mau e bom controle glicêmico e indivíduos sem diabetes a fim de avaliar se o perfil proteico entre esses grupos apresentaria diferenças densitométricas. Para isso, as proteínas dos eritrócitos, tanto de membrana quanto do citosol foram extraídas, separadas por eletroforese SDS-PAGE, analisadas por densitometria e identificadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. Do total de 11 bandas proteicas visualizadas no gel de poliacrilamida, 4 bandas apresentaram diferenças no valor de volume relativo e essas bandas foram identificadas como proteína 4.1, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), banda 3 ou mistura de proteína 4.1 e banda 3 ou mistura de G3PDH e banda 3. No grupo DM1 com bom controle glicêmico e no grupo controle, os volumes relativos da banda proteica identificada como mistura de proteína 4.1 e banda 3 foram respectivamente superiores e estatisticamente significativos ($18\% \pm 5$ e $23\% \pm 6$, $P < 0,05$) em relação ao grupo com mau controle glicêmico ($13\% \pm 2$). O volume relativo da mistura de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e banda 3 ($43\% \pm 11$) no grupo DM1 com mau controle glicêmico foi estatisticamente superior ($P < 0,05$) em relação ao volume da banda 3 ($26\% \pm 4$) na condição de bom controle glicêmico e no controle não houve detecção de banda. Para o grupo DM2 com mau e bom controle glicêmico, os volumes relativos da enzima G3PDH não apresentaram diferença com significância estatística ($P < 0,05$). No entanto, a G3PDH não foi identificada no grupo controle. Diante dos resultados obtidos para o grupo DM1, os volumes relativos tanto da proteína 4.1 e a G3PDH foram superiores na condição de mau controle glicêmico, enquanto para o grupo DM2, o volume relativo de G3PDH foi superior na condição de mau e bom controle glicêmico em relação ao controle. Portanto, é possível inferir que os eritrócitos de pacientes DM1 e DM2 com mau controle glicêmico possam apresentar propriedades reduzidas de deformabilidade e estabilidade mecânica, uma vez que a proteína 4.1 participa na regulação do citoesqueleto. Já a enzima citosólica G3PDH pode indicar uma condição de estresse oxidativo celular, uma vez que nessa condição, a enzima se associa ao domínio citosólico da proteína integral de membrana, a banda 3.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is characterized by a hyperglycemic condition due to deficiency in synthesis, insulin action, or both. The early diagnosis of diabetes, coupled with the adequate treatment and monitoring, allows minimizing and delaying the appearance of associated complications (nephropathy, retinopathy, cardiovascular disease, among others), improving the quality of life of those affected and reducing the costs of the public health system. Currently, the diagnostic criteria for diabetes are still based on fasting blood glucose, oral glucose tolerance test or glycated hemoglobin dosage. Considering the complexity and complications of the disease and that the diagnosis is only made in the measurement of glucose and in the measurement of glycated hemoglobin, it is of the extreme importance that new reliable biomarkers for the diagnosis, treatment and prognosis of the pathology be investigated. Therefore, the objective of the study was to detect and identify erythrocyte membrane and cytoplasm proteins of patients with type 1 DM, type 2 DM with poor and good glycemic control and individuals without diabetes in order to assess whether the protein profile between these groups would present densitometric differences. For this, both erythrocyte membrane and cytosol proteins were extracted, separated by SDS-PAGE electrophoresis, analyzed by densitometry and identified by MALDI-TOF type mass spectrometry. From the total of 11 protein bands visualized on the polyacrylamide gel, 4 bands presented differences in the relative volume value and these bands were identified as protein 4.1, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), band 3 or protein 4.1 and band 3 or mixture of G3PDH and band 3. In the DM1 group with good glycemic control and in the control group, the relative volumes of the protein band identified as a mixture of protein 4.1 and band 3 were respectively higher and statistically significant ($18\% \pm 5$ and $23\% \pm 6$, $P < 0.05$) in relation to the group with poor glycemic control ($13\% \pm 2$). The relative volume of the mixture of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and band 3 ($43\% \pm 11$) in the DM1 group with poor glycemic control was statistically superior ($P < 0.05$) in relation to the volume of band 3 ($26\% \pm 4$) in the condition of good glycemic control and there was no band detection in the control. For the DM2 group with poor and good glycemic control, the relative volumes of G3PDH enzyme did not present difference with statistical significance ($P < 0.05$). However, G3PDH was not identified in the control group. Considering the results obtained for the DM1 group, the relative volumes of both protein 4.1 and G3PDH were higher in the condition of poor glycemic control, while for the DM2 group, the relative volume of G3PDH was higher in the condition of poor and good glycemic control in relation to control group. Therefore, it is possible to infer that the erythrocytes of DM1 and DM2 patients with poor glycemic control may have reduced deformability and mechanical stability properties, since protein 4.1 participates in cytoskeletal regulation. In case of the cytosolic enzyme G3PDH, it can indicate a condition of cellular oxidative stress, since in this condition, the enzyme associates with the cytosolic domain of the membrane integral protein, band 3.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. VIAS METABÓLICAS RELACIONADAS ÀS COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELLITUS.	25
Figura 2. VIA DO SORBITOL	26
Figura 3. CONSEQUÊNCIAS DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE C (PKC) INDUZIDA POR HIPERGLICEMIA.	28
Figura 4. VIA DA GLICOLISE ANAERÓBICA, EMBDEN-MEYERHOF.	34
Figura 5. MODELO ESQUEMÁTICO DA ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO CITOESQUELETO DE ERITRÓCITOS.	38
Figura 6. MODELO ESQUEMÁTICO DA ORIENTAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANAS DE ERITRÓCITOS HUMANOS.	40
Figura 7. COMPLEXOS DA PROTEÍNA 4.1 NO ERITRÓCITO	42
Figura 8. MODELO ESQUEMÁTICO DAS INTERAÇÕES DA ANQUIRINA COM AS PROTEÍNAS INTEGRAIS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITO.	45
Figura 9. AÇÃO DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO-DESIDROGENASE NA VIA GLICOLÍTICA	47
Figura 10. ETAPAS COMUMENTE SEGUIDAS EM UMA ANÁLISE PROTEÔMICA “BOTTOM-UP”.	50
Figura 11. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DO GRUPO DM1 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE	58
Figura 12. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DO GRUPO DM1 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE REVELADO COM PRO-Q EMERALD 488.	60
Figura 13. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DO GRUPO DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE	63
Figura 14. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DO GRUPO DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE REVELADO COM PRO-Q EMERALD 488.	65
Figura 15. GRÁFICO DOS VOLUMES OBTIDOS NA DENSITOMETRIA POR CÁLCULO DE NORMALIZAÇÃO.	67

Figura 16. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS DE ERITRÓCITOS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.....	68
Figura 17. MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA DOS ERITRÓCITOS DE PACIENTES COM DM1, DM2 E PACIENTE SEM DIABETES..	70
Figura 18. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ELETROFORESE DE EXTRATO DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA.	72
Figura 19. INTERAÇÃO DE 4.1R COM BANDA 3.....	76
Figura 20. MODELO REPRESENTATIVO DA MODULAÇÃO METABÓLICA DEPENDENTE DE G3PDH EM ERITRÓCITOS HUMANOS.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. PRINCIPAIS PROTEÍNAS TRANSMEMBRANAIS E PERIFÉRICAS DA MEMBRANA DO ERITRÓCITO.	36
Tabela 2. CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA COLETA E ESTUDO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	52
Tabela 3. DADOS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS DM1, DM2 E CONTROLE	57
Tabela 4. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DO GRUPO DM1 COM BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.	59
Tabela 5. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM1 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF.....	61
Tabela 6. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DO GRUPO DM2 COM BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.	64
Tabela 7. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,3-DPG	- 1,3-Difosfoglicerato
2,3-DPG	- 2,3-Difosfoglicerato
3-PG	- 3-Fosfoglicerato
ADA	- American Diabetes Association
AE1	- <i>Anion Exchanger 1</i> , Transportador Aniônico, Banda 3
AFM	- Microscopia de Força Atômica
AGEs	- Produtos Finais de Glicação Avançada
Ank	- Gene que Codifica a Anquirina
ATP	- Adenosina Trifosfato
CA	- Anidrase Carbônica Citosólica
DAG	- Diacilglicerol
DCCT	- <i>Diabetes Control and Complications Trial Research Group</i> - Grupo de Pesquisa para Controle do Diabetes e Triagem das Complicações
DCV	- Doença Cardiovascular
DM	- <i>Diabetes Mellitus</i>
DM1	- <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DM2	- <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DMG	- <i>Diabetes Mellitus</i> gestacional
DPGM	- Difosfoglicerato Mutase
DRD	- Doença Renal do Diabetes
eNOS	- Óxido Nítrico Endotelial
EROs	- Espécies Reativas de Oxigênio
ET-1	- Endotelina-1
G3PDH	- Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
G6P	- Glicose-6-fosfato
GAD	- Glutamato Descarboxilase
GEs	- Enzimas Glicolíticas
GFAT	- Frutose-6-fosfato Amidotransferase
GlcNAc	- N-acetilglucosamina-6-fosfato
GLUT4	- Transportador de Glicose Tipo 4
GPB	- Glicoforina B
GPC	- Glicoforina C

GSH	- Glutathiona Reduzida
HbA1C	- Hemoglobina Glicada
HK	- Hexoquinase
HLA	- Gene do Complexo Leucocitário Humano
IA-2	- Anticorpo Anti Tirosina Fosfatase
ICAM-4	- Proteína de Membrana Adesiva
LDH	- Enzima Lactato Desidrogenase
Lu	- Proteína de ligação a Laminina
MALDI-TOF	- Espectrometria de Massa do tipo MALDI-TOF
PAI-1	- Inibidor do Ativador do Plasminogênio Endotelial
PFK	- Enzima Fosfofrutoquinase
PGK	- Fosfoglicerato Quinase
PK	- Enzima Piruvato Quinase
PKC	- Proteína Quinase C
PPP	- Via das Pentoses
RD	- Retinopatia Diabética
SBD	- Sociedade Brasileira de Diabetes
Sp1	- Fator de transcrição, promotor específico da RNA polimerase II ou proteína específica 1.
UCPs	- Proteína 2 de Desacoplamento de Células β
UDPGlcNAc	- Uridina Difosfato N-acetilglucosamina
UKPDS	- <i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
VEGF	- Fator de Crescimento Endotelial Vascular
ZnT8	- Anticorpo Anti Transportador de Zinco

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1.OBJETIVO GERAL.....	17
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1. DIABETES.....	18
3.2.CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES	18
3.2.1. <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 1 (DM1).....	19
3.2.2. <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2 (DM2).....	20
3.2.3 <i>DIABETES MELLITUS</i> GESTACIONAL (DMG)	20
3.2.4.OUTROS TIPOS DE DIABETES.....	21
3.3. EPIDEMIOLOGIA DO DM.....	21
3.4 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS E CONTROLE GLICÊMICO	22
3.5 COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS AO DM	22
3.6 ERITRÓCITOS: PROTEÍNAS DE MEMBRANA E DO CITOESQUELETO	30
3.6.1. ESPECTRINA	39
3.6.2. ACTINA	41
3.6.3. PROTEÍNA 4.1	41
3.6.4. ANQUIRINA	43
3.6.5. BANDA 3 OU TROCADOR ANIÔNICO (AE1)	45
3.6.6. GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE	47
3.7. ANÁLISE PROTEÔMICA PARA OS ESTUDOS DOS ERITRÓCITOS	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	51
4.2. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS E DE MEMBRANA DOS ERITRÓCITOS.....	52
4.3. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	52
4.4.ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL DESNATURANTE (SDS-PAGE)	53
4.5.VISUALIZAÇÃO DOS GÉIS, CAPTURA DAS IMAGENS E DENSITOMETRIA...53	
4.6.CLIVAGEM DAS PROTEÍNAS POR TRIPSINIZAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS E ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	53
4.7.OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS ESPECTROS DE MASSA.....	54

4.8. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS54

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....54

4.10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ERITRÓCITOS.....55

5.RESULTADOS.....56

5.1.CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS.....56

5.2. ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO POOL DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO GRUPO DM1 COM HEMOGLOBINA GLICADA ≥ 7%, <7% E GRUPO CONTROLE.57

5.3. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DAS BANDAS PROTEICAS C, H, I, J E K DOS GRUPOS DM1 COM HEMOGLOBINA GLICADA ≥ 7%, <7% E GRUPO CONTROLE.59

5.4. PERFIL ELETROFORÉTICO DO POOL DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO GRUPO DM1 COM HEMOGLOBINA GLICADA ≥ 7%, <7% E GRUPO CONTROLE REVELADO COM PRO-Q EMERALD 48860

5.5. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM1 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF61

5.6. ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO POOL DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO GRUPO DM2 COM HEMOGLOBINA GLICADA ≥ 7%, <7% E GRUPO CONTROLE62

5.7. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DAS BANDAS PROTEICAS C, H, I, J E K DOS GRUPOS DM2 COM HEMOGLOBINA GLICADA ≥ 7%, <7% E GRUPO CONTROLE.63

5.8. PERFIL ELETROFORÉTICO DO POOL DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO GRUPO DM2 COM HEMOGLOBINA GLICADA ≥ 7%, <7% E GRUPO CONTROLE REVELADO COM PRO-Q EMERALD 48864

5.9. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF65

5.10. COMPARAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DAS BANDAS H, I, J E K ENTRE OS GRUPOS DM1, DM2 E RESPECTIVOS SUBGRUPOS (BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO) E GRUPO CONTROLE66

5.11. ANÁLISE COMPARATIVA DA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS DE ERITRÓCITOS ENTRE OS GRUPOS DE DM COM HBA1C \geq 7% E HBA1C $<$ 7%) E GRUPO CONTROLE	68
5.12. MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA DOS ERITRÓCITOS DE PACIENTES COM DM1, DM2 E SEM DIABETES	69
6. DISCUSSÃO	71
6.1. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS	71
6.2. ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DOS POOLS DE PROTEÍNAS ERITROCITÁRIAS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.	71
6.2.1. PERFIS ELETROFORÉTICOS DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.....	71
6.2.2. DIFERENÇAS NA DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS ERITROCITÁRIAS, PROTEÍNA 4.1 E GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE NAS CONDIÇÕES ESTUDADAS.....	74
6.3. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE REVELADO COM PRO-Q EMERALD 488.....	79
6.4. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE ERITRÓCITOS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE	80
6.5. ANÁLISE DA MICROSCOPIA POR VARREDURA DE ERITRÓCITOS DE PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 1, TIPO 2 E PACIENTES NÃO DIABÉTICOS.....	80
6.CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO 1 – ANÁLISE PROTEÔMICA.....	97

1.INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é definido como um grupo de doenças metabólicas decorrente da hiperglicemia estabelecida devido aos defeitos na ação, secreção da insulina ou em ambas. Devido a sua complexidade e cronicidade, o DM exige assistência médica contínua com estratégias para a manutenção do controle glicêmico e consequente redução das complicações crônicas inerentes à patologia (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016).

Os diferentes tipos de DM são categorizados com base na etiologia da patologia. O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) ocorre devido à destruição das células β pancreáticas, ocasionando uma deficiência total de insulina. No *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), um progressivo defeito na secreção da insulina promove resistência a ação da mesma. O *Diabetes mellitus* Gestacional (DMG) é caracterizado pela hiperglicemia detectada no segundo ou terceiro trimestre de gestação. Além disso, existem outros grupos menos específicos de DM, cujas causas são variadas e são pertencentes a essa categoria, os defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, etc (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016).

Os tipo 1 e tipo 2 eram conhecidos como diabetes juvenil e adulto, respectivamente. No entanto, os tradicionais paradigmas de que o diabetes tipo 2 ocorre apenas em adultos e o tipo 1 em crianças e adolescentes já não são aceitos, pois o DM1 e DM2 ocorrem em ambas as populações. Crianças com DM1 apresentam os sintomas típicos e marcantes de poliúria/polidipsia e aproximadamente um terço desenvolvem cetoacidose diabética (CAD). Os pacientes com DM2 podem apresentar ocasionalmente CAD. O aparecimento do diabetes tipo 1 em adultos apresenta início variável e ao contrário do que se observa em crianças, os sintomas clássicos nem sempre são observados. Já o DM2 não é diagnosticado por muitos anos, pois a hiperglicemia se desenvolve gradualmente e, em estágios anteriores, os sintomas muitas vezes não são suficientemente graves para o paciente perceber. No entanto, mesmo pacientes não diagnosticados possuem maior risco de desenvolver complicações macrovasculares e microvasculares. Enfim, as dificuldades para o diagnóstico do diabetes podem ocorrer em todas as faixas etárias, tornando-se mais evidente ao longo do tempo (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016).

Os critérios diagnósticos para o diabetes são baseados na glicemia em jejum, teste oral de tolerância a glicose ou dosagem de hemoglobina glicada (AMERICAN-

DIABETES-ASSOCIATION, 2016), a qual também é empregada como método padrão ouro para o controle glicêmico de longo prazo de indivíduos diabéticos. Outros indicadores de hiperglicemia ainda não disponíveis para a rotina da prática clínica são 1,5 anidroglicitol, marcador de hiperglicemia pós-prandial e a albumina glicada, marcador de controle glicêmico de curto prazo (SBD, 2016).

Diante dos escassos marcadores ainda empregados para diagnóstico e monitoramento do controle glicêmico do diabetes e da complexidade da doença, é de extrema importância que novos biomarcadores confiáveis para o diagnóstico, tratamento e prognóstico da patologia sejam pesquisados. Estudos empregando eritrócitos de pacientes com DM têm mostrado alterações na expressão de proteínas de membrana, bem como, mudanças morfológicas nas células eritrocitárias (BUYS *et al.*, 2013). A análise de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes com DM2 revelou a expressão diferencial de 42 proteínas quando comparadas com o controle (indivíduos sem DM). Das 42 proteínas, 3 foram identificadas, sendo elas, a flotilina-1, arginase e syntaxina 1C (JIANG *et al.*, 2003). A interação entre a arginase solúvel com flotilina-1 está envolvida no desenvolvimento de DM2 (JIANG *et al.*, 2006). Buys e colaboradores (2013) mostraram mudanças morfológicas na ultraestrutura de eritrócitos de pacientes com DM2 e estas modificações estão correlacionadas com o processo de glicação de proteínas do citoesqueleto, como a espectrina (BUYS *et al.*, 2013). Portanto, o presente estudo propõe o estudo comparativo do perfil das proteínas de membrana e citosólicas dos eritrócitos de pacientes com DM1, DM2 em relação à indivíduos sem diabetes.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Estudar perfil proteico da membrana e do citoplasma eritrocitários de pacientes com DM1, DM2 e indivíduos que não apresentam a doença.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras de sangue de pacientes com DM1 e DM2, com bom controle glicêmico e mau controle glicêmico e indivíduos sem DM (grupo controle);
- Padronizar os parâmetros bioquímicos, hemoglobina glicada e glicemia;
- Extrair as proteínas de membrana e citosólica da massa eritrocitária;
- Separar as proteínas de membrana e citosólica por eletroforese unidimensional desnaturante;
- Aplicar análise densitométrica nas bandas proteicas;
- Identificar as proteínas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF;
- Detectar a glicação de proteínas por revelação com corante específico.

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DIABETES

Diabetes mellitus (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos endócrinos caracterizado por hiperglicemia. Essa doença metabólica multifactorial é caracterizada por dois defeitos principais: diminuição da produção de insulina pelas células beta pancreáticas e resistência à ação da insulina em diferentes tecidos-alvo (músculo, fígado e tecido adiposo). A insuficiência ou ineficiência da insulina promove o desequilíbrio no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (PRABHAKAR, 2016). Esse grupo de doenças metabólicas, crônicas e complexas, exige além de controle glicêmico, cuidados médicos contínuos para minimizar as complicações secundárias a saúde (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016).

A hiperglicemia crônica do diabetes provoca complicações secundárias, em longo prazo, tais como a disfunção e a falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, sistema nervoso e vasos sanguíneos, causando doença cardiovascular e amputações de membros inferiores, aumentando assim, os casos de morbidade e mortalidade dessa doença. Os diabéticos podem diminuir a prevalência dessas complicações monitorando a glicemia, a pressão arterial e o perfil lipídico a fim de mantê-los nos intervalos de referência (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016; PRABHAKAR, 2016).

3.2.CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES

A Associação Americana de Diabetes (ADA) propõe uma classificação baseada na etiologia do DM (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016). As quatro grandes categorias do diabetes são:

- Diabetes Tipo 1 (DM1): resultante de uma deficiência absoluta de insulina causada pela destruição autoimune das células β do pâncreas;
- Diabetes Tipo 2 (DM2): causado pela combinação da resistência à insulina e a ação do hormônio, com consequente aumento da produção hepática de glicose. Muitos pacientes com esta forma de diabetes são obesos e, sabe-se que a obesidade causa um aumento na resistência à insulina. É usualmente designada como “diabetes da maturidade” ou “diabetes não-insulina dependente”.

- *Diabetes mellitus* gestacional (DMG): definido como qualquer grau de intolerância à glicose detectada no segundo ou terceiro trimestre de gestação.
- Outras formas específicas de diabetes: são reconhecidos mais de 56 tipos específicos de diabetes. Como principais grupos destacam-se: defeitos genéticos na função das células β (MODY, *maturity diabetes of the young*); defeitos genéticos na ação da insulina; doenças do pâncreas; endocrinopatias; indução química ou por drogas; infecções; formas incomuns de diabetes mediados pelo sistema imune; síndromes genéticas associadas ao diabetes em alguns casos (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016).

3.2.1. *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1)

O DM1 é uma doença crônica onde ocorre destruição parcial ou total das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, acarretando na incapacidade de produção de insulina. É uma forma de diabetes resultante de resposta celular autoimune, que ocorre comumente na infância, no entanto pode ocorrer em qualquer faixa etária. A auto-imunidade em DM1 é específica para as células beta produtoras de insulina (YOON; JUN, 2001). Conhecido anteriormente como diabetes juvenil essa forma corresponde de 7-12% do número de casos de diabetes (INTERNATIONAL-DIABETES-FEDERATION, 2015).

O DM1 apresenta marcadores autoimunes característicos, que são os autoanticorpos para insulina, autoanticorpos para GAD (GAD65), autoanticorpo para tirosina fosfatase IA-2 e IA-2b e autoanticorpo para transportador de zinco 8 (ZnT8). A presença de um ou mais marcadores define o DM1 (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016).

O DM1 tem etiologia multifatorial com relevante influência genética e ambientais. Os genes do complexo leucocitário humano (HLA) estão fortemente associados à susceptibilidade da doença, bem como, fatores ambientais, como, como a exposição a agentes virais, toxinas ambientais, alimentos, entre outros (HALLER *et al.*, 2005).

Nesta forma de diabetes, a taxa de destruição de células β pode ser variável, e conforme as células produtoras de insulina vão sendo destruídas os sintomas da doença se manifesta. Alguns pacientes podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença, enquanto outros, normalmente adultos, podem ter uma parcela de células β que funcionam por muitos anos, retardando a cetoacidose

(AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016). Portanto, o processo de destruição das células beta pode ocorrer em meses ou anos e os sintomas aparecem com a destruição da massa das ilhotas de Langerhans (HALLER *et al.*, 2005).

Apesar do DM1 ser caracterizado como autoimune, algumas formas não possuem etiologia conhecida e são chamadas formas idiopáticas, onde os pacientes têm insulinoopenia permanente com propensão a cetoacidose. Normalmente se enquadram nessa categoria, os ascendentes de Africanos ou Asiáticos que herdaram a patologia (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016).

3.2.2. *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2)

O DM2 constitui 87-91% de todos os casos de diabetes. (INTERNATIONAL-DIABETES-FEDERATION, 2015). DM2 é um grave problema de saúde global. Na maioria dos países, o diabetes aumentou ao lado de rápidas mudanças culturais e sociais, como, envelhecimento das populações, a crescente urbanização, mudanças na dieta, sedentarismo e comportamentos insalubres (GROEN *et al.*, 2005).

Existem provavelmente muitas causas diferentes desta forma de diabetes. Embora as etiologias específicas não sejam conhecidas, a destruição auto-imune das células- β não ocorre, e os pacientes não apresentam qualquer das outras causas listadas nos outros tipos de diabetes (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2014).

3.2.3 *Diabetes mellitus* gestacional (DMG)

O Diabetes mellitus gestacional (DMG) é definido como o diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, que não foi evidenciado antes da gestação. Portanto, mulheres diagnosticadas com diabetes no primeiro trimestre da gestação devem ser classificadas como tendo diabetes pré-gestacional, seja DM2 ou mais raramente, DM1 (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2017).

Os riscos associados para o desenvolvimento do DMG foram estratificados em três níveis: (1) Risco Alto: a presença de qualquer um dos fatores, como obesidade, diabetes em familiares de primeiro grau, história pessoal de intolerância à glicose e gestação anterior com neonato macrossômico, é suficiente para o enquadramento nesta categoria; (2) Risco Médio: não se enquadra como risco alto ou baixo; (3) Risco Baixo, o indivíduo deve apresentar as seguintes características: idade < 25 anos, etnia

associada a baixo risco, ausência de diabetes em familiares de primeiro grau, ganhos de peso normal antes e durante a gravidez, ausência de história de concentrações de glicose séricas anormais, ausência de intercorrências obstétricas prévias e ausência de glicosúria (BUCHANAN *et al.*, 2007).

O DMG tem impactos negativos para o feto e neonato, que devem ser considerados. Neste espectro, pode-se citar morte fetal intrauterina, má-formação congênita, hipoglicemia do recém-nato e macrosomia, que leva ao aumento do número de partos por cesáreas. (KIM, C. *et al.*, 2002).

3.2.4.Outros tipos de diabetes

A categoria designada “outros tipos de diabetes” agrupa tipos menos comuns de DM, cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados. A apresentação clínica desse grupo é bastante variada e depende da alteração de base. Portanto, nessa categoria estão incluídos defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e outras condições (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016).

3.3. EPIDEMIOLOGIA DO DM

O DM é uma das doenças crônicas mais comuns no mundo, sendo considerado um problema de saúde pública mundial. A prevalência de DM em 2015 foi aproximadamente 415 milhões de pessoas em todo o mundo (8,8% dos adultos entre 20 e 79 anos), sendo que cerca de 75% das pessoas atingidas vivem em países de baixa e média renda e, estima-se que em 2040, 642 milhões de pessoas deverão ter diabetes. No Brasil, o DM atinge um pouco mais de 10 milhões de pessoas na faixa etária de 20 a 79 anos (INTERNATIONAL-DIABETES-FEDERATION, 2015).

Aproximadamente 5 milhões de pessoas (20 a 79 anos) morreram devido ao diabetes em 2015 no mundo, o equivalente a uma morte a cada seis segundos. Portanto, o diabetes é responsável por 14,5% da mortalidade global quando comparada as outras causas de morte. Este número foi superior ao número combinado de mortes por doenças infecciosas (1,5 milhões de mortes por AIDS, 1,5 milhões por tuberculose e 0,6 milhões por malária, em 2013). Cerca de metade (46,6%) dos óbitos por diabetes ocorrem em pessoas com menos de 60 anos (INTERNATIONAL-DIABETES-FEDERATION, 2015).

3.4 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS E CONTROLE GLICÊMICO

O diagnóstico de diabetes é baseado através da quantificação da glicose plasmática. Com o decorrer dos anos, estudos mostraram a necessidade da padronização das dosagens e dos critérios utilizados tanto para o diagnóstico quanto para o controle glicêmico do DM. Esses critérios foram estabelecidos em 1997 e aprovados pela Organização Mundial de Saúde para utilização na rotina laboratorial. (SACKS *et al.*, 2011).

Além da quantificação da glicemia após jejum e teste de tolerância oral à glicose, em 2009, pesquisadores propuseram o uso da hemoglobina glicada fração A1C (HbA1C) como critério diagnóstico, pois a dosagem de HbA1C refletiria as concentrações de glicose no sangue a longo prazo (SACKS *et al.*, 2011).

Atualmente, são aceitos três critérios de diagnóstico de diabetes com a utilização da glicemia:

- Sintomas clássicos de hiperglicemia acrescidos de glicemia casual ≥ 200 mg/dL. Compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições, ou
- Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL. Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste no outro dia, ou
- Glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75g de glicose ≥ 200 mg/dL. O teste de tolerância a glicose deve ser realizado com os cuidados preconizados pela Organização Mundial de Saúde, com coleta para diferenciação de glicemia em jejum e 120 minutos após a ingestão de glicose, ou
- HbA1c $\geq 6,5\%$ a ser confirmada em outra coleta, porém dispensável em caso de sintomas ou glicemia ≥ 200 mg/dL (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2016).

3.5 COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS AO DM

O DM promove em longo prazo, complicações microvasculares e macrovasculares. As complicações microvasculares, causadas pelo dano de pequenos vasos sanguíneos, incluem nefropatia (doença renal), retinopatia (lesão ocular) e neuropatia (dano nervoso), enquanto a complicação macrovascular, causada

por danos em grandes vasos sanguíneos, inclui artérias e veias que transportam sangue para o coração, tendo como consequência a doença cardiovascular venosa (DCV), cérebro e extremidades inferiores, podendo levar a amputação de membros (DCCT, 1995; UKPDS, 1998; WEI *et al.*, 1998; PRABHAKAR, 2016).

A retinopatia diabética (RD) é uma das principais complicações relacionadas ao DM. Após 20 anos do desenvolvimento da doença, mais de 90% dos pacientes com DM1 e 60% daqueles com DM2 apresentaram algum tipo de retinopatia. Na RD, a principal causa de baixa visual é o edema macular, podendo estar presente desde as fases iniciais da retinopatia até em casos nos quais há doença proliferativa grave, acometendo 30% dos pacientes com mais de 20 anos de diabetes (KLEIN *et al.*, 1984).

A neuropatia diabética, outra complicação resultante do desenvolvimento da doença, é um distúrbio neurológico demonstrável clinicamente ou por métodos laboratoriais em pacientes diabéticos. As principais manifestações clínicas de comprometimento somático são dormência ou queimação em membros inferiores, formigamento, pontadas, choques, agulhadas em pernas e pés, desconforto ou dor ao toque de lençóis e cobertores e queixas de diminuição ou perda de sensibilidade tátil, térmica ou dolorosa. Ainda que a predominância de sintomas e sinais se localize nos membros inferiores, os membros superiores (mãos e braços) podem também ser afetados. Alguns pacientes evoluem para perda total de sensibilidade, sem apresentar sinais prévios (SBD, 2016).

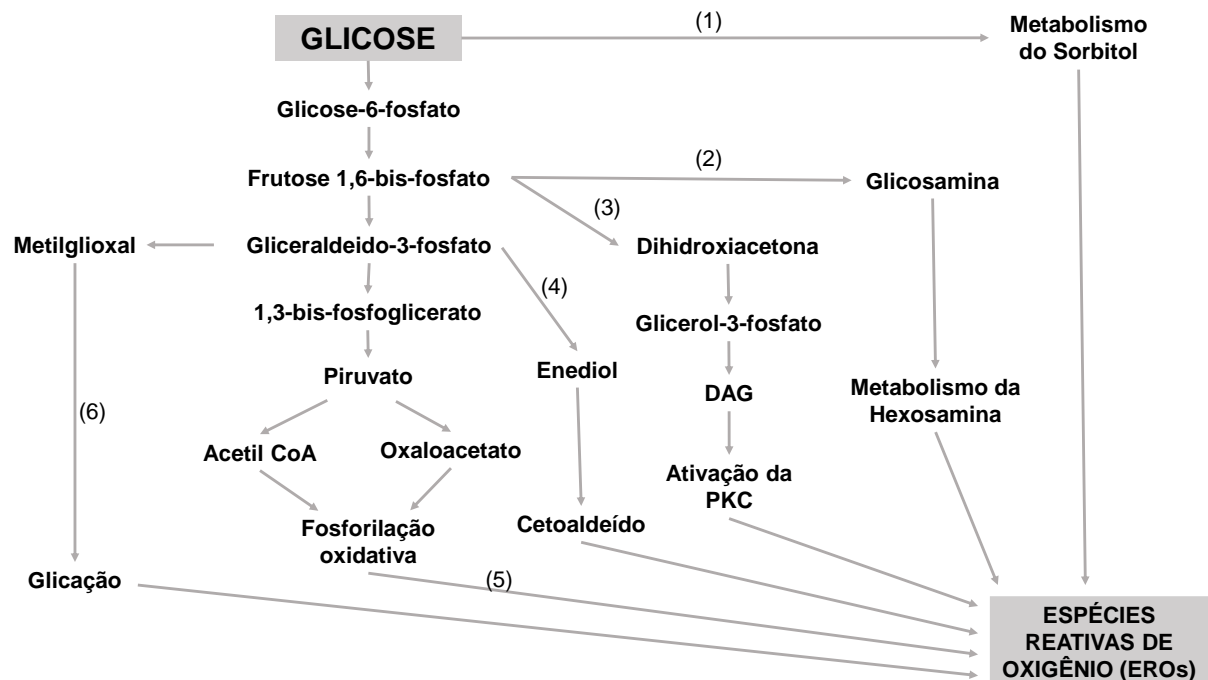
Outra complicação crônica da DM é a nefropatia, também conhecida como doença renal do diabetes (DRD), que acomete cerca de 35% dos pacientes (SBD, 2016), através de um aumento da excreção urinária de albumina e em alguns casos apresenta a redução isolada da taxa de filtração glomerular (DE BOER *et al.*, 2011). A DRD quando associada à doença cardiovascular (DCV) ocasiona um aumento da mortalidade nesses pacientes (SBD, 2016). A doença macrovascular do paciente com diabetes é caracterizada por uma doença aterosclerótica que também incide em uma população não diabética, no entanto, é mais precoce, mais frequente e mais grave. Sendo assim, a DCV é a maior causa de morbidade e mortalidade nos pacientes com DM (KANNEL; MCGEE, 1979; STRATTON *et al.*, 2000; DEEDWANIA; FONSECA, 2005).

Existe uma relação direta entre o grau de controle de glicemia crônica e o risco de complicações tardias do rim, da retina e neurológicas. Essa correlação tem sido documentada em estudos epidemiológicos e ensaios clínicos para o DM1 e DM2

(STRATTON *et al.*, 2000). O importante papel da hiperglicemia causal no desenvolvimento e progressão das complicações tem sido documentado em ensaios clínicos. Diabéticos tipo 1 que reduzem a glicemia média exibem uma incidência significativamente menor de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) (UKPDS, 1998).

Tanto a hiperglicemia como a resistência a insulina são fatores chaves na patogênese das complicações macrovasculares (UKPDS, 1998; GINSBERG, 2000; BROWNLEE, 2001). A glicose acumulada interfere em diferentes vias metabólicas levando a produção de compostos e metabólitos, além de espécies reativas de oxigênio (EROs), que danificam organelas celulares e consequentemente os órgãos sistêmicos (BROWNLEE, 2001; SHEETZ; KING, 2002). A Figura 1 mostra o provável mecanismo pelo qual a hiperglicemia induz a superprodução de EROs. Cinco hipóteses amplamente aceitas para explicar como a hiperglicemia causa patologia vascular e neural, foram levantadas: (1) via do sorbitol, (2) via de Hexosamina, (3) via da proteína quinase C, (4) via da cetoaldeído, (5) fosforilação oxidativa e (6) via formação de metilglioxal e glicação avançada (FIGURA 1) (BROWNLEE, 2001). A hiperglicemia crônica aumenta a disponibilidade de substratos que favorecem o acúmulo de moléculas associadas às complicações do diabetes como o sorbitol, as hexosaminas, a proteína quinase C (PKC) e produtos de glicação avançada (AGEs).

FIGURA 1. VIAS METABÓLICAS RELACIONADAS ÀS COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELLITUS.



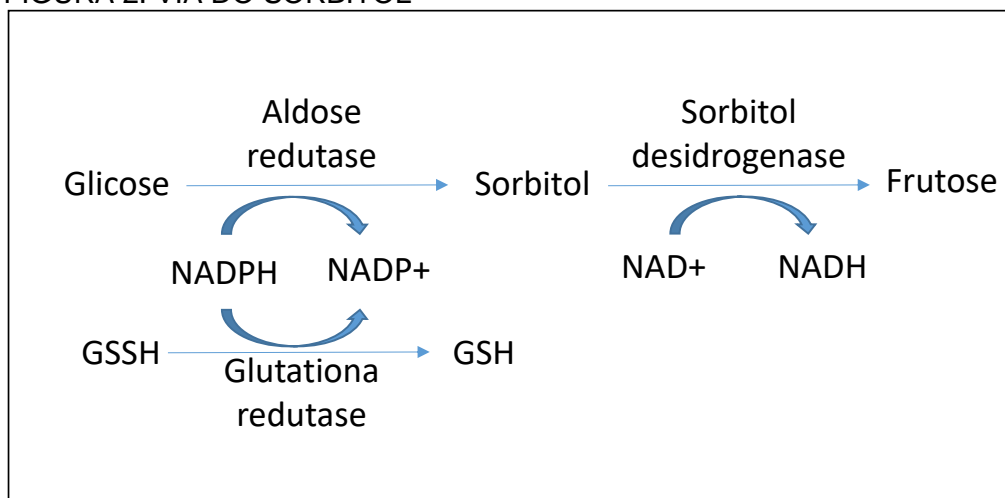
Seis vias bioquímicas ao longo das quais o metabolismo da glicose pode formar EROs. Sob condições fisiológicas, a glicose é utilizada principalmente na glicólise e fosforilação oxidativa (5). Em condições de hiperglicemia, os níveis excessivos de glicose podem inibir o processo glicolítico e inibir o catabolismo do gliceraldeído, o que faz com que a glicose, a frutose-1,6-bifosfato e o gliceraldeído-3-fosfato sejam desviados para formação de cetoaldeído (4); ativação de PKC (3); formação de metilglioxal e glicação (6); metabolismo do sorbitol (1); metabolismo de hexosamina (2); e fosforilação oxidativa (5).

Fonte: (ROBERTSON, 2004)

Via do Sorbitol

O sorbitol é o intermediário desta via e está implicado em complicações diabéticas, especialmente nos danos microvasculares à retina, rins e nervos (ENGERMAN *et al.*, 1994). A glicose não utilizada pelas células na produção de energia é desviada para a via poliólica e convertida em sorbitol em uma reação catalisada pela aldose redutase e dependente do cofactor nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que é também necessário para a regeneração da forma oxidada da glutatona em glutatona reduzida (GSH). Assim, a via do sorbitol ativada reduz NADPH para manter o sistema redox intracelular e consequentemente induz o estresse oxidativo (BROWNLEE, 2001) (FIGURA 2). Além disso, o sorbitol não atravessa as membranas celulares e seu acúmulo acarreta estresse osmótico celular (CHUNG *et al.*, 2003).

FIGURA 2. VIA DO SORBITOL



A via poliol na indução do estresse oxidativo
 Fonte: adaptado (PRABHAKAR, 2016)

No passo seguinte da reação, a enzima sorbitol desidrogenase catalisa a oxidação de sorbitol para frutose, produzindo NADH a partir de NAD⁺. A frutose pode ser convertida em frutose-6-fosfato pela hexoquinase e ser utilizada na via da glicólise. No entanto, se os níveis de glicose no sangue estão elevados, a produção de sorbitol será favorecida em relação a via glicolítica (WELLS-KNECHT *et al.*, 1995), levando ao aumento da razão citosólica NADH/NAD⁺, que acarretará na inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH). Com a inibição da G3PDH, a concentração de trioses fosfato aumentará e essas moléculas serão desviadas para a produção de metilglioxal, um precursor dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e para produção de diacilgliceróis (DAG), que ativarão a enzima PKC (BROWNLEE, 2001).

Via da Hexosamina

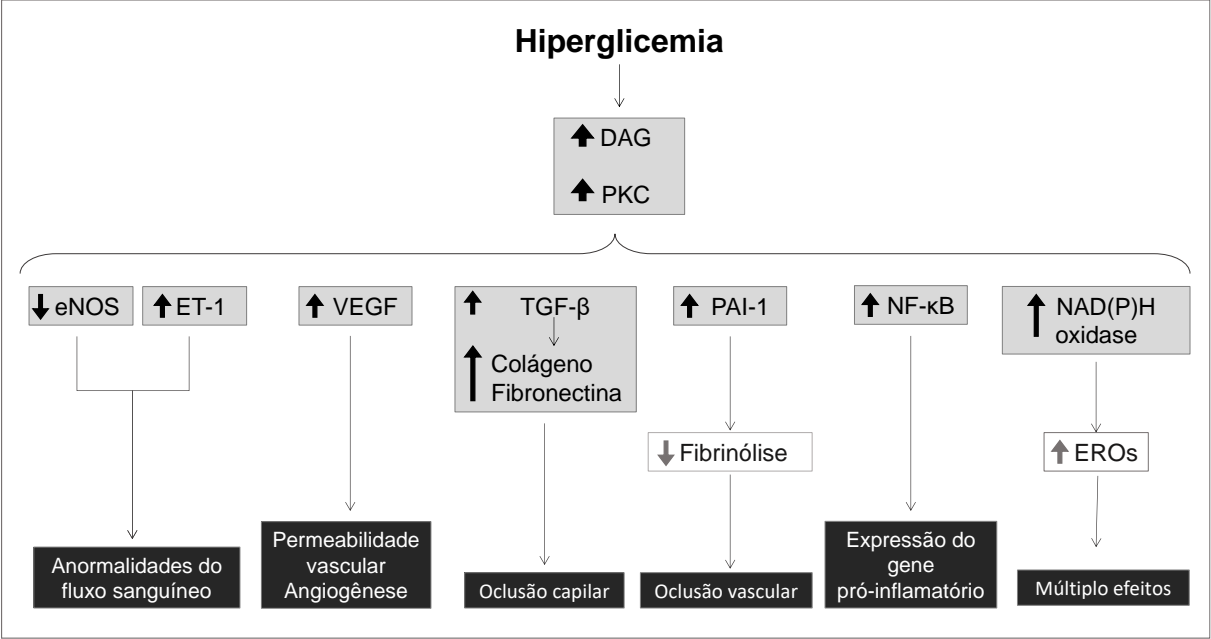
O excesso de glicose intracelular também é desviado para a via da hexosamina, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo devido à inibição da produção do antioxidante GSH (HORAL *et al.*, 2004). Na via da hexosamina, a frutose-6-fosfato é convertida em N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc) pela enzima frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT). A GlcNAc é então convertida em uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDPGlcNAc), que torna-se substato da reação catalisada pela O-GlcNAc transferase, cuja função é transferir GlcNAc para os resíduos de serina e treonina de proteínas, como os fatores de transcrição. A

transferência elevada de GlcNAc para fatores de transcrição como Sp1 resulta na produção aumentada de inibidor-1-do ativador de plasminogênio (PAI), envolvido em doenças trombóticas e fatores de transformação do crescimento TGF- α e β 1, que participam do processo de angiogênese, frequente na retinopatia diabética (KADONAGA *et al.*, 1988; BROWNLEE, 2001).

Via da proteína quinase C (PKC)

A PKC pertence a uma família de enzimas, que através da fosforilação de grupos hidroxil dos resíduos de aminoácidos serina e treonina, controlam as funções de outras proteínas, como as que atuam nas cascatas de transdução de sinal. As enzimas PKC são ativadas devido ao aumento da concentração de DAG ou Ca^{2+} (INOBUCHI *et al.*, 1992; KOYA; KING, 1998). A ativação de PKC pode afetar a produção de óxido nítrico endotelial (eNOS), endotelina-1(ET-1), do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), do fator de crescimento β (TGF- β), do inibidor-1-do ativador do plasminogênio endotelial (PAI-1), do fator nuclear kappa B (NF-kB) e NADPH oxidases (PRABHAKAR, 2016). Essas alterações pode resultar em uma série de consequências patogênicas. Os principais produtos e consequências com o aumento da PKC causado pela hiperglicemia está representado na (FIGURA 3).

FIGURA 3. CONSEQUÊNCIAS DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE C (PKC) INDUZIDA POR HIPERGLICEMIA.



A hiperglicemia aumenta o teor de diacilglicerol (DAG), que ativa a PKC, que por sua vez promove uma série de consequências patogênicas afetando a expressão da endotelina sintetase, de óxido nítrico (eNOS), endotelina-1 (ET-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de transformação do crescimento β (TGF- β), do inibidor do ativador do plasminogênio endotelial (PAI-1), do fator nuclear kappa- β (NF- κ β) e NAD(P) H oxidases.

FONTE: Adaptado de: (BROWNLEE, 2001)

Via do Cetoaldeído

A exposição a longo prazo a altas concentrações de glicose diminui a atividade da gliceraldeído-fosfato desidrogenase (G3PDH) nas ilhotas pancreáticas (SAKAI *et al.*, 2003), levando ao aumento de gliceraldeído-3-fosfato (G3P), o qual se autooxida (FIGURA 1, VIA 4), gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e α -cetoaldeídos, duas substâncias potencialmente tóxicas que reagem e alteram biomoléculas, como proteínas, nucleotídeos, lípidos (WOLFF; DEAN, 1987). Embora o G3P seja considerado um secretagogo de insulina, quando presente em excesso atua como inibidor da secreção de insulina (HELLMAN *et al.*, 1974).

Via da oxidação fosforilativa

As concentrações elevadas de glicose acarretam na superprodução de doadores de elétrons (NADH e FADH₂) pelo ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), que geram um potencial de membrana elevado devido ao bombeamento exacerbado de prótons pela membrana mitocondrial interna, o que por sua vez aumenta a produção

de superóxido mitocondrial (FIGURA 1, via 5) (DU *et al.*, 2000). Com o acúmulo de superóxido, a célula sofrerá danos, como a diminuição da atividade da enzima G3PDH e alterações nas proteínas (JONES, 2008).

Já foi relatado que o número de mitocôndrias diminui em 38% nas células musculares de indivíduos resistentes à insulina quando comparados ao grupo controle (MORINO *et al.*, 2005). A lipotoxicidade e a glucotoxicidade em indivíduos obesos e em DM2 induzem a super expressão da proteína 2 de desacoplamento de células β (UCPs), proteínas presentes na membrana da mitocôndria que desacoplam a oxidação dos substratos da síntese de ATP, dissipando o potencial de energia de membrana e, conseqüentemente diminuindo a síntese de ATP, que promove a secreção insuficiente de insulina (AZZU; BRAND, 2010; WANG, M. *et al.*, 2010). Além disso, a diminuição da oxidação de ácidos graxos, causada pelo reduzido número de mitocôndrias ou disfunção mitocondrial, aumenta os níveis de acil-CoA e DAG, que através da ativação de PKC, inibem o recrutamento do receptor de glicose de membrana, o GLUT4, diminuindo a captação de glicose mediada por insulina (LOWELL; SHULMAN, 2005).

Formação de Produtos finais de glicação avançada (AGEs)

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são um grupo heterogêneo de moléculas formadas a partir da reação não enzimática de açúcares redutores com grupos amino livres em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (FIGURA 1, via 6), formando primeiramente a base de *Schiff*, a qual então sofre rearranjos para a formação de produtos Amadori. Os AGEs são formados em uma taxa constante e lenta. No entanto, sua acumulação é acentuadamente acelerada no diabetes devido à maior disponibilidade de glicose (THORPE; BAYNES, 2003). Nos pacientes com DM, a produção de metilglioxal, intermediário para a formação de AGEs, ocorre principalmente a partir dos intermediários triose-fosfato na via glicolítica, que incluem dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato (PHILLIPS; THORNALLEY, 1993).

Vários estudos têm demonstrado que o metilglioxal é significativamente elevado no plasma de diabéticos (KNECHT *et al.*, 1992; MCLELLAN *et al.*, 1992; YAMADA *et al.*, 1994; BEISSWENGER, P. *et al.*, 1999) e correlaciona com controle glicêmico (KNECHT *et al.*, 1992; BEISSWENGER, P. *et al.*, 1993; NIWA *et al.*, 1993; MCLELLAN *et al.*, 1994). Esse intermediário de AGEs também pode desempenhar um papel no desenvolvimento de uma série de complicações diabéticas, incluindo a

nefropatia diabética, como sugerido por várias linhas de evidência, incluindo estudos dos estágios iniciais da disfunção renal diabética, onde a hiperfiltração glomerular está associada a níveis elevados de metilglioxal (BEISSWENGER, P. *et al.*, 1997). Além disso, níveis elevados de metilglioxal e seus metabólitos podem estar associados à albuminúria precoce (BEISSWENGER, P. J. *et al.*, 1995; BEISSWENGER, P.; HOWELL; NELSON; *et al.*, 2003).

A produção de AGEs pode causar danos aos tecidos alvo por três mecanismos gerais: modificação de proteínas intracelulares, de proteínas e componentes da matriz extracelular e das proteínas plasmática (BROWNLEE, 1994; VANDER JAGT *et al.*, 1997). A formação e acúmulo de AGEs mediada pela hiperglicemia resultante do DM têm sido amplamente implicados em todas as complicações macrovasculares e microvasculares (STITT, 2003). A reatividade de AGEs pode ser amplificada além da reação inicial entre biomoléculas e açúcares, pois as células dos pulmões, fígado, rins têm receptores para AGEs. Estes receptores ligam-se aos AGEs e deflagram cascatas de biosinalização que contribuem no desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas relacionadas com diabetes, incluindo aterosclerose, asma, artrite, infarto do miocárdio, nefropatia, retinopatia ou neuropatia (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2005).

Desta forma, como a hiperglicemia é o principal fator desencadeante das complicações diabéticas, um marcador para avaliar as concentrações plasmáticas médias da glicemia nestes pacientes é relevante, bem como métodos para o monitoramento do controle glicêmico que sejam particularmente sensíveis a qualquer episódio de hiperglicemia.

3.6 ERITRÓCITOS: PROTEÍNAS DE MEMBRANA E DO CITOESQUELETO

Os eritrócitos, hemáceas ou células vermelhas são células anucleadas e, consequentemente devido à ausência de transcrição e tradução para substituir as proteínas danificadas, os eritrócitos têm uma vida útil de aproximadamente 120 dias, após esse período os eritrócitos são destruídos por macrófagos no sistema reticuloendotelial. O glóbulo vermelho maduro é adaptado para realizar a ligação e o transporte de oxigênio e sua entrega a todos os tecidos. A membrana, a hemoglobina e as proteínas envolvidas nas vias metabólicas dos glóbulos vermelhos interagem para modular o transporte de oxigênio, proteger a hemoglobina dos danos induzidos pelas EROs e manter o ambiente osmótico da célula. A forma bicôncava dos glóbulos

vermelhos fornece uma área maior para troca respiratória e a passagem dessa célula através de microcapilares, o que é conseguido por uma modificação drástica da sua forma bicôncava, tornada possível apenas pela perda do núcleo e das organelas citoplasmáticas (WEINSTEIN; SURGENOR, 1974).

O citoplasma de um eritrócito contém cerca de 250 milhões de moléculas de hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio e dióxido de carbono em todos os tecidos do corpo. Nos pulmões, a hemoglobina liga-se ao oxigênio em troca de dióxido de carbono, sendo oxigênio entregue aos tecidos em pH e pressão do gás fisiológicos, enquanto o dióxido de carbono é retirado dos tecidos (BARASA; SLIJPER, 2014). A hemoglobina assume diferentes conformações quando associada (oxihemoglobina ou oxi-Hb) e não associada (desoxihemoglobina ou desoxi-Hb) ao oxigênio, devido à exposição ou não do ferro do grupo heme para interagir com o oxigênio. Além disso, o pH influencia na ligação do oxigênio a hemoglobina. Tanto a oxi quanto a desoxihemoglobina ligam-se aos prótons H^+ , mas em pH fisiológico, a desoxihemoglobina tem maior afinidade à eles, de modo que a medida que a oxihemoglobina perde oxigênio, o próton H^+ liga-se a hemoglobina. Assim, nos tecidos, a concentração de oxigênio dissolvido é baixa e as do dióxido de carbono e do próton H^+ dissolvidos são elevadas, proporcionando a troca de íons e gases, ou seja, o oxigênio é liberado da hemoglobina para os tecidos e dióxido de carbono e os prótons H^+ são transferidos dos tecidos para a corrente sanguínea. Nos pulmões, onde a concentração de oxigênio dissolvido é alta e de dióxido de carbono dissolvido é baixo, os efeitos reversos se combinam para aumentar o carregamento de hemoglobina com oxigênio e diminuir a solubilidade do dióxido de carbono (BALDWIN, 1975; KIM, H.; GREENBURG, 2004).

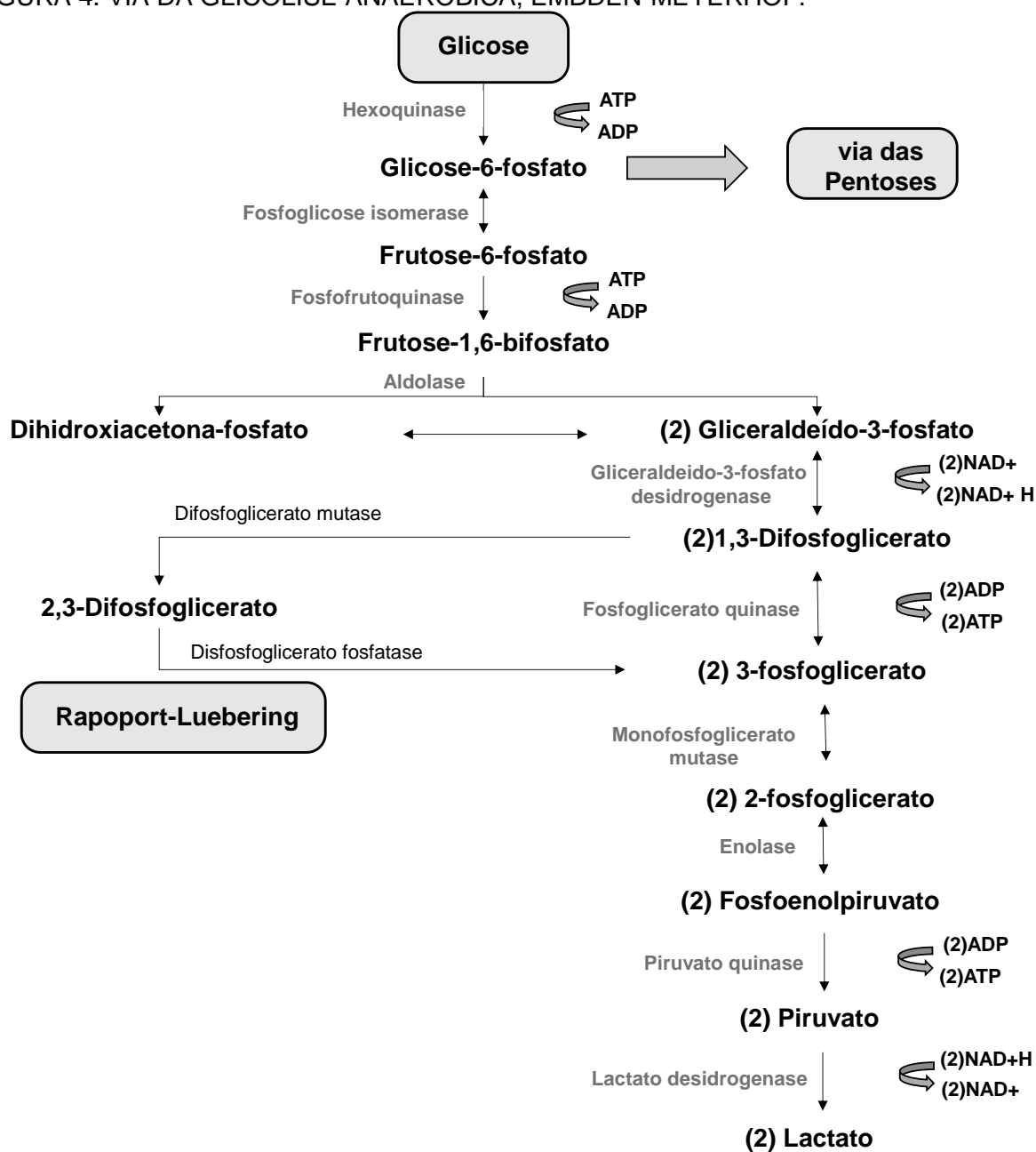
Além dessas atividades, a hemoglobina atua na regulação das atividades das enzimas glicolíticas (GEs) do eritrócito. A desoxihemoglobina e as enzimas glicolíticas possuem os mesmos sítios de ligação no domínio amino terminal da proteína integral da membrana do eritrócito conhecida por banda 3. Portanto, a desoxihemoglobina e enzimas glicolíticas competem por esses sítios. Estudos recentes mostram que as GEs, como as G3PDH, aldolase, fosfofrutoquinase (PFK), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), estão amplamente limitadas à membrana quando a oxihemoglobina está uniformemente distribuída no citoplasma, sendo que as três primeiras ligam-se a sítios específicos no domínio NH_2 terminal da banda 3 e as duas últimas enzimas citadas possuem o sítios de ligação próximo a banda 3, mas não diretamente a ela. As GEs estão organizadas em complexos na membrana, cuja

montagem é regulada pela oxigenação da hemoglobina e fosforilação da banda 3. Quatro linhas de evidência demonstram que as GEs são pelo menos parcialmente montadas em complexos multiméricos próximos da extremidade aminoterminal da banda 3: (1) um antígeno ou anticorpo específico para os resíduos da banda 3 desloca todas as GEs da membrana; (2) a fosforilação da tirosina da extremidade aminoterminal da banda 3 libera reversivelmente todas as GEs da membrana; (3) a desoxigenação de glóbulos vermelhos desacopla todas as GEs da membrana, consistente com a capacidade estabelecida da desoxi-Hb e (4) observou-se um grande aumento na acessibilidade dos epítomos enzimáticos quando as GEs estão dissociadas da membrana. Portanto, a desoxigenação da hemoglobina e fosforilação da banda 3 liberam as GEs para catalisarem os substratos da via glicolítica (CAMPANELLA *et al.*, 2005).

Durante a sua vida intravascular, os eritrócitos requerem energia para manter um número de funções vitais da célula, como manutenção da glicólise; a manutenção do gradiente de eletrólitos entre o plasma e o citoplasma de glóbulos vermelhos através da atividade de bombas de membrana de adenosina trifosfato (ATP); síntese de glutatona e outros metabólitos; metabolismo de purina e pirimidina; manutenção do ferro da hemoglobina em seu estado funcional, ferroso; proteção de enzimas metabólicas, hemoglobina e proteínas de membrana contra o estresse oxidativo; e por fim, preservação da assimetria de fosfolípidos de membrana. A glicose é o substrato primário para a manutenção das células vermelhas, uma vez que a glicose entra na célula, ela é fosforilada a glicose-6-fosfato (G6P) pela enzima hexoquinase (HK). Devido à falta de núcleo e mitocôndrias, as células sanguíneas maduras são incapazes de gerar energia através da via glicolítica aeróbica. Em vez disso, os eritrócitos dependem da conversão anaeróbica da glicose pela via de Embden-Meyerhof para a geração e armazenamento de fosfatos de alta energia (ATPs) (FIGURA 4), na qual a glicose é convertida em duas moléculas de lactato e tem um ganho de duas moléculas de ATPs. Esses ATPs são utilizados na manutenção da forma da hemácia e garantem o funcionamento das bombas eletrolíticas presentes na membrana celular (MIWA, 1983; VAN WIJK; VAN SOLINGE, 2005). As moléculas de 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG), produzidas pela reação da G3PD, podem ser utilizadas através da reação catalisada pela fosfoglicerato quinase (PGK) na via de Embden-Meyerhof ou podem ser convertidas em 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG) pela reação catalisada pela difosfoglicerato mutase (DPGM), pela via de Rapoport- Luebering. A degradação do 2,3-DPG a 3-fosfoglicerato (3-PG) é catalisada pela atividade da

disfosfoglicerato fosfatase (DPGP). A via Rapoport-Luebering desvia a glicólise do passo de geração de ATP, consequentemente, quando a glicose é metabolizada por esta via o balanço final na produção de ATP é zero (VAN WIJK; VAN SOLINGE, 2005). Nos eritrócitos da maior parte das espécies de mamíferos, o 2-3-DPG reduz a afinidade do oxigênio pela hemoglobina. Assim, o 2,3-DPG é extremamente necessário para a manutenção do equilíbrio da afinidade da hemoglobina por oxigênio dentro de um intervalo fisiológico (BENESCH; BENESCH, 1967).

FIGURA 4. VIA DA GLICOLISE ANAERÓBICA, EMBDEN-MEYERHOF.



Esquema da via glicolítica Embden-Meyerhof, mostrando o balanço da produção de 2 ATPs e 2 NADH. FONTE: adaptado de (VAN WIJK; VAN SOLINGE, 2005)

Além da via glicolítica anaeróbica, outras vias, como o via das pentoses e sistema da glutatona, atuam no citosol e membrana celular para manutenção do equilíbrio redox da célula contra os processos oxidativos. Cerca de 10 % da glicose no eritrócito é metabolizada pelo via das pentoses. Na via das pentoses, a glicose-6-fosfogluconato, proveniente da via glicolítica, é oxidada em dióxido de carbono e NADP^+ é reduzido a NADPH. O produto dessa via retorna à via glicolítica ou pela gliceraldeído-3-fosfato ou pela frutose-6-fosfato. Não há ganho energético, pois nessa via não há produção de ATP, mas ela é essencial para proteção da célula contra

agentes oxidantes, sendo a produção do NADPH um produto importante para a via redutora da glutathione (BARRETO, 1978). O NADPH é a coenzima utilizada na conversão da glutathione oxidada (GSSH) à sua forma reduzida (GSH), através da glutathione redutase. A GSH tem como função reduzir baixos níveis de peróxido de hidrogênio que se forma espontaneamente. No processo da redução dos peróxidos ou das ligações dissulfetos, a GSH é convertida em glutathione oxidada (BARRETO, 1978; GHEZZI, 2013).

Outra característica importante dos eritrócitos é a capacidade de deformabilidade e consequente adaptabilidade em vasos de pequeno calibre. Além da macrovasculatura, os eritrócitos percorrem a microvasculatura, cujo calibre pode medir um terço do diâmetro eritrocitário, causando altas tensões de cisalhamento na célula (BUYS *et al.*, 2013), que são suportadas devido à associação entre membrana plasmática e citoesqueleto. A membrana plasmática dos eritrócitos exibe um comportamento único, alta flexibilidade (100 vezes mais elástica do que uma membrana de látex com a mesma espessura), rápida resposta as tensões aplicadas ao fluido (constante de tempo na faixa de 100 milissegundos), e é mais forte do que o aço, em termos de resistência estrutural. Essa função é diretamente relacionada a estrutura e composição de sua membrana celular discóide e citoesqueleto (MOHANDAS; GALLAGHER, 2008).

As proteínas da membrana do eritrócito, que recebe o nome “ghost”, após extração das proteínas citoplasmáticas por seguidas lavagens em soluções hipotônicas, quando foram detectadas em gel de eletroforese desnaturante SDS-PAGE, receberam números em ordem crescente, iniciando com o número 1 (um) pela banda de maior massa molecular. Atualmente, algumas proteínas ainda são identificadas pelo nome numérico, como a banda 3 e a proteína 4.1 (YU, J *et al.*, 1973).

A composição da membrana plasmática do eritrócito contém 39,5% de proteínas, 35,1% de lipídeos e 5,8% de carboidratos, presentes na face extracelular da bicamada lipídica. A membrana lipoprotéica eritrocitária é composta por mais de 50 proteínas transmembranais que variam de centenas a milhões de cópias por célula. Uma grande fração de proteínas transmembranais define os vários antígenos do grupo sanguíneo (REID; MOHANDAS, 2004). As proteínas que compõem a membrana eritrocitária são estruturalmente classificadas em integrais ou transmembranárias e periféricas ou extramembranárias. Essas proteínas do citoesqueleto membranário formam uma rede subjacente a membrana. Este esqueleto é responsável pela forma, bicôncava normal ou anormal, em caso de defeitos

genéticos dos glóbulos vermelhos e representa 60% da massa protéica de toda a membrana. As proteínas integrais possuem uma porção hidrofóbica que atravessa a bicamada lipídica e uma porção menos hidrofóbica que são os domínios intracelulares e extracelulares, os quais interagem com moléculas próximas a membrana celular. As principais proteínas transmembranais e periférica do eritrócitos estão representadas na TABELA 1 (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

TABELA 1. PRINCIPAIS PROTEÍNAS TRANSMEMBRANAIS E PERIFÉRICAS DA MEMBRANA DO ERITRÓCITO.

Proteínas transmembranais	Banda 3, <i>anion exchanger 1</i> (AE1)
	Glicoforina A (GPA)
	Glicoforina B (GPB)
	Glicoforina C (GPC)
	Transportado da glicose (GLUT 1)
	Receptor da Insulina
Proteínas periféricas	Espectrina
	Anquirina
	Banda 4.2
	Banda 4.1
	Actina
	Tropomiosina

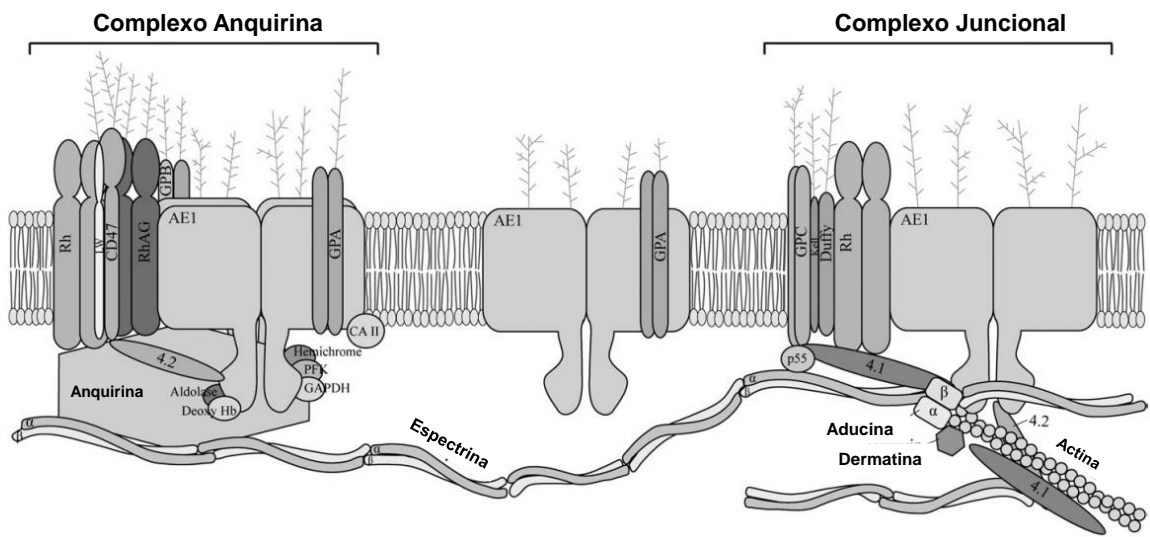
FONTE: (MURADOR; DEFFUNE, 2007; MOHANDAS; GALLAGHER, 2008)

As proteínas transmembranais exibem heterogeneidade funcional, servindo como proteínas de transporte, proteínas de adesão envolvidas em interações de eritrócitos com outras células sanguíneas e células endoteliais, como receptores de sinalização e outras atividades ainda indefinidas (REID; MOHANDAS, 2004; MOHANDAS; GALLAGHER, 2008). As proteínas de membrana com função de transporte incluem a banda 3 (transportadora de íons), aquaporina 1 (transportadora de água), GLUT1 (transportadora de glicose), proteína de antígeno Kidd (transportador de ureia), RhAG (transportador de gás), bombas transportadoras de íons como a Na^+/K^+ -ATPase e a Ca^{2+} -ATPase, proteínas cotransportadoras de íons como a $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$, a Na^+/Cl^- , a Na^+/K^+ e a K^+/Cl^- . As proteínas de membrana com função adesiva incluem ICAM-4, que interage com integrinas e Lu, a proteína de ligação à laminina (MOHANDAS; GALLAGHER, 2008).

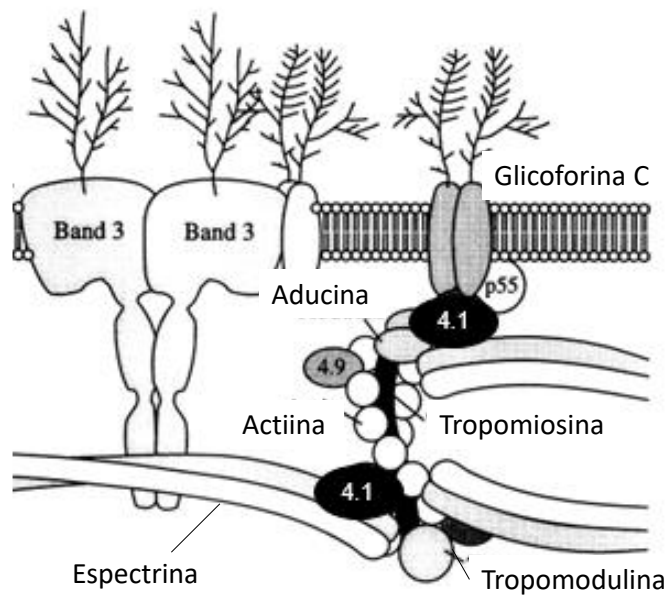
Algumas das proteínas transmembranais, sendo as principais a banda 3 e a glicoforina C (GPC), formam complexos multiproteicos juntamente com proteínas do citoesqueleto, destacando a espectrina e a actina, formando uma rede tridimensional para manter a integridade da estrutura do eritrócito, permitindo que o mesmo circule por pequenos capilares sem se romper (BENNETT, V, 1985; NICOLAS *et al.*, 2003; AN, X.; MOHANDAS, 2008). Nesses complexos multiproteicos destacam-se o Complexo da Anquirina e o Complexo Juncional (FIGURA 5). No Complexo da Anquirina, o citoesqueleto formado por tetrâmeros de espectrina interage com a anquirina, que está ligada ao domínio citoplasmático da proteína banda 3 na sua forma tetramérica (YI *et al.*, 1997). A proteína 4.2 liga-se à banda 3 na mesma posição e pode aumentar a interação da proteína transmembranal com a anquirina (NICOLAS *et al.*, 2003; VAN DEN AKKER *et al.*, 2010). Na formação do Complexo Juncional, a proteína integral de membrana, banda 3 dimérica (FIGURA 5A) (VAN DEN AKKER *et al.*, 2010) ou glicoforina C (FIGURA 5B) (TSE; LUX, 1999), liga-se a protofilamentos de actina, tropomiosina, tropomodulina e aducina, e esse complexo multiproteico interage com tetrâmeros de espectrina. A proteína 4.1, que também se liga à proteína de membrana integral, interage com espectrina beta e aumenta a afinidade da ligação de espectrina-actina (NICOLAS *et al.*, 2003; VAN DEN AKKER *et al.*, 2010). Outras proteínas, em número menores, estão envolvidas nesses complexos macromoleculares, como a p55, tropomiosina, troponina (BENNETT, V, 1985) e as proteínas transmembranais glicoforina C (GPC), glicoforina B (GPB), Rh, Duffy, Kell (FIGURA 5A) (SALOMAO *et al.*, 2008).

FIGURA 5. MODELO ESQUEMÁTICO DA ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO CITOESQUELETO DE ERITRÓCITOS.

(A)



(B)



(A) A membrana é ancorada a uma rede elástica bidimensional de proteínas do citoesqueleto. A interação vertical envolve domínios citoplasmáticos da banda 3 (AE1) e antígeno Rh (RhAG), anquirina, proteína 4.2 e espectrina e as interações horizontais são representadas pelas ligações laterais de espectrinas com o complexo juncional. Glicoforina A (GPA); glicoforina C (GPC); actina (F-actin). Fonte: (VAN DEN AKKER *et al.*, 2010)

(B) Nesse modelo a glicoforina C interage com um complexo multiprotéico envolvendo a actina, tropomiosina e tropomodulina, intermediada pela proteína 4.1 e aducina, que então liga-se aos tetrâmeros de espectrina.

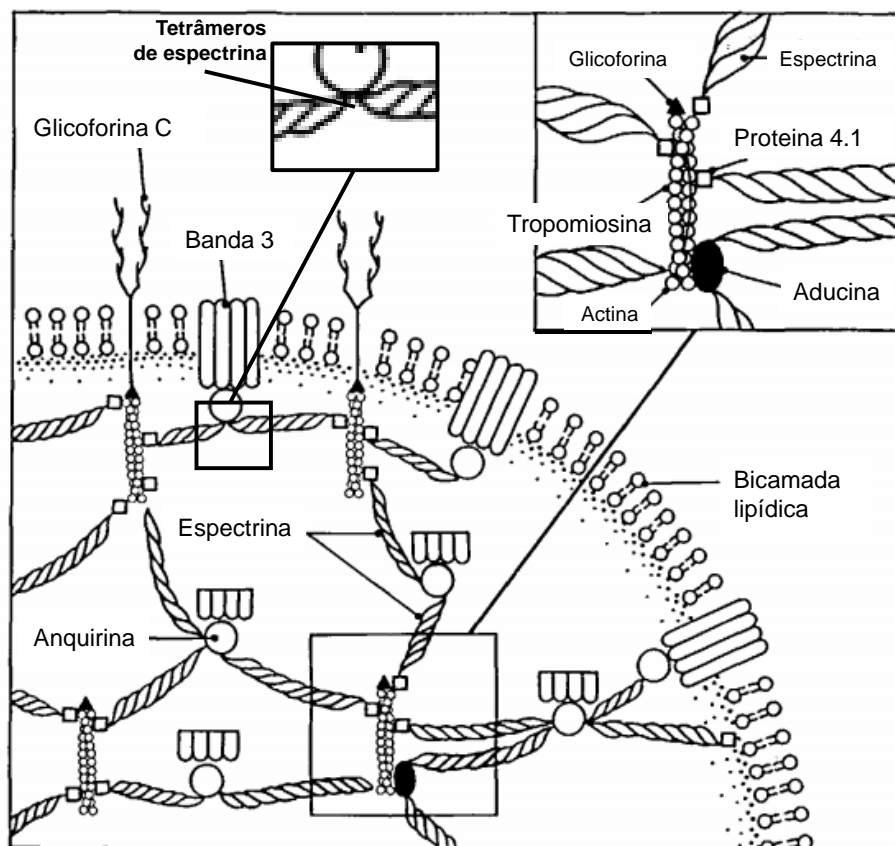
FONTE: adaptado (TSE; LUX, 1999)

3.6.1. Espectrina

A primeira proteína isolada de eritrócito desprovido de hemoglobina, chamado de “ghosts”, foi a espectrina, que recebeu esse nome por relacionar a proteína com espectro (MARCHESI, V. T.; STEERS, 1968; BENNETT, V, 1985).

A espectrina é uma proteína em forma de bastão, flexível, de aproximadamente 100nm de comprimento, composta por duas cadeias polipeptídicas, alfa (α) e beta (β), com massa molecular de 260.000Da e 225.000Da, respectivamente. As subunidades estão dispostas lado a lado e antiparalelas para formar heterodímeros, que associam-se fortemente em suas extremidades formando tetrâmeros, e interagem em múltiplos locais ao longo de seu comprimento. Os heterodímeros de espectrina e suas associações com proteínas de membrana formam uma malha subjacente à superfície citoplasmática da membrana plasmática do eritrócito (FIGURA 6) (SHOTTON *et al.*, 1978; BENNETT, V, 1990). A sequência disponível das subunidades α e β indica que estes polipeptídeos são homólogos e ambos contêm múltiplas versões de uma sequência repetitiva de 106 aminoácidos (SPEICHER; MARCHESI, 1984). Entre as regiões de cabeça e cauda da molécula, grande parte do comprimento da espectrina é atribuída ao número de repetições, 20 repetições para a α -espectrina e 17 repetições para a β -espectrina (BRODERICK; WINDER, 2005).

FIGURA 6. MODELO ESQUEMÁTICO DA ORIENTAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANAS DE ERITRÓCITOS HUMANOS.



A espectrina interage com proteínas intramembranais mediada por proteínas de ligação, sendo as principais a anquirina, actina, aducina, tropomiosina, proteína 4.1, formando uma rede tridimensional subjacente a membrana do eritrócito. A figura também mostra os tetrâmeros de espectrina, que se formam com a associação de dois heterodímeros dessa proteína do citoesqueleto.

FONTE: (BENNETT, V, 1990)

Quatro a seis moléculas de espectrina estendem-se radialmente a partir de cada protofilamento de actina central, esse contendo aproximadamente 10 subunidades, unidos pela proteína 4.1, formando um complexo proteico que interage com as proteínas transmembranais do eritrócito. Esse complexo é em grande parte estabilizado pela proteína tropomiosina. Há outra interação da espectrina com a membrana intermediada pela anquirina, na qual a proteína do citoesqueleto possui um sítio de ligação específico de associação com a anquirina, localizado na região média da subunidade β . A anquirina, por sua vez, associa-se ao domínio citoplasmático da proteína integral de membrana, a Banda 3. Essas interações repetem-se ao longo de toda camada subjacente da membrana do eritrócito formando a rede do citoesqueleto (BRANTON *et al.*, 1981; MARCHESI, V., 1983; BENNETT, V, 1990).

3.6.2. Actina

A actina eritrocitária também é uma proteína do citoesqueleto e está presente em 400.000 a 500.000 cópias por célula. É uma proteína de 33.000Da e apresenta-se como oligômeros curtos, precisamente definidos contendo uma média de 12-14 monômeros de actina (BENNETT, V, 1989), associadas a múltiplas moléculas de espectrina (BRENNER; KORN, 1979). Nessa associação outras proteínas estão envolvidas, como a proteína 4.1, a aducina e a tropomiosina, para formar o Complexo Juncional.

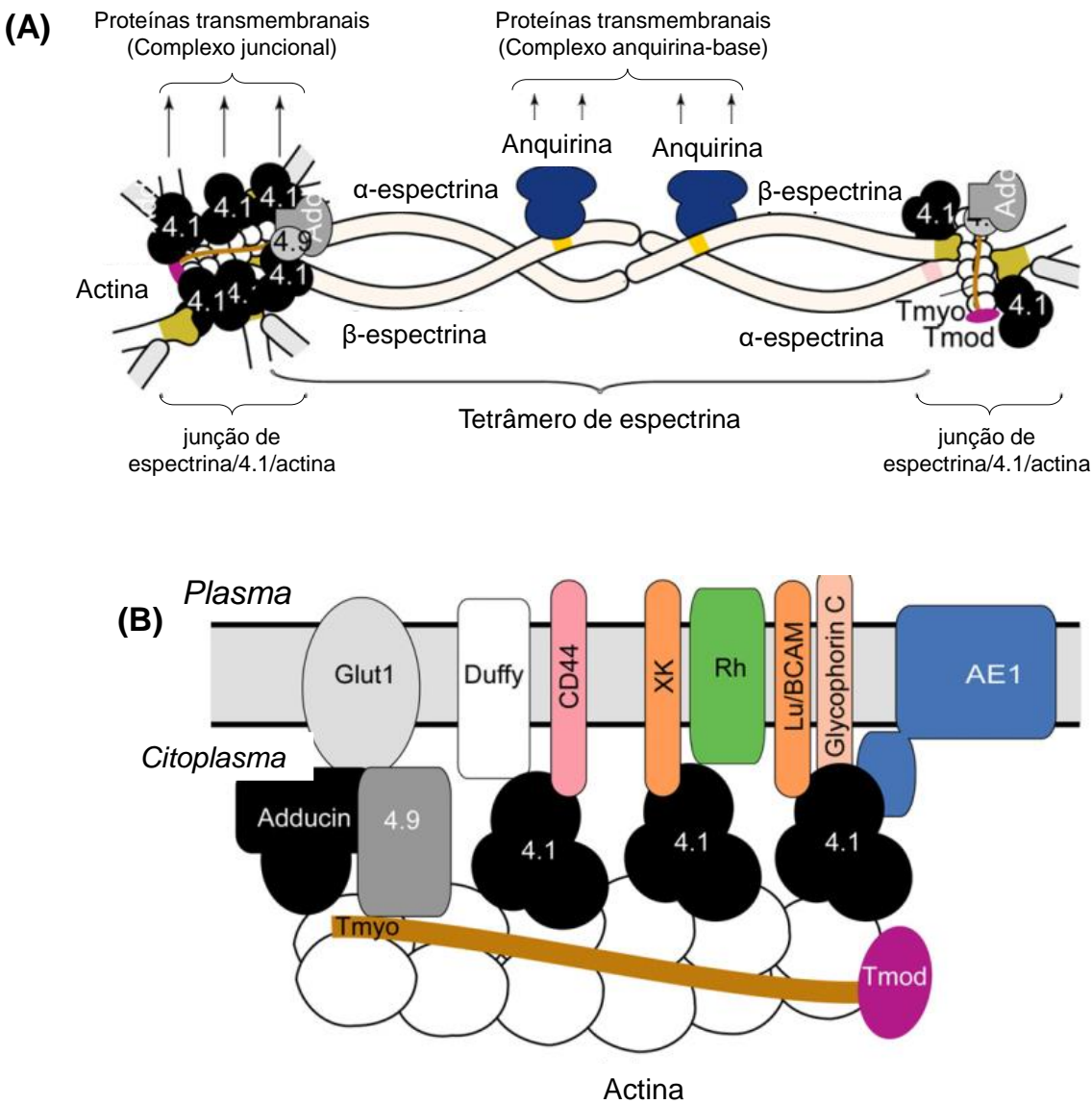
3.6.3. Proteína 4.1

A proteína 4.1, com peso molecular em torno de 80 kDa (BENNETT, V, 1985), está presente em cerca de 200.000 cópias por célula. Primeiramente foi identificada em eritrócitos humanos e posteriormente em outras células como os neurônios. Para distinguir essas proteínas homólogas, nomeou-se proteína 4.1R (4.1R), a que se refere ao eritrócito humano (BAINES *et al.*, 2014).

A proteína 4.1R foi descoberta em eritrócitos humanos e recebeu essa designação devido a sua identificação como banda 4.1 em gel de SDS de membranas de eritrócitos (YU, J *et al.*, 1973). 4.1R é um dos componentes principais do esqueleto proteico da membrana eritrocitária, atuando na regulação da estabilidade da membrana através da sua interação com espectrina, actina e a banda 3, formando complexos juncionais (FIGURA 7A) (BAINES *et al.*, 2014). A proteína 4.1 interage diretamente com a espectrina tetramérica em um domínio específico proporcionando a interação da actina com a espectrina (BENNETT, V, 1989). A interação entre proteína 4.1 e espectrina é dependente da fosforilação. A afinidade da interação entre proteína 4.1 e espectrina reduz cerca de 5 vezes quando a proteína 4.1 foi fosforilada. Por outro lado, a fosforilação da espectrina acarreta um ligeiro aumento da sua afinidade pela proteína 4.1. Logo, a fosforilação pode levar a um relaxamento da rede do citoesqueleto e à formação de uma estrutura de membrana mais flexível, que é importante para a função das células vermelhas (EDER *et al.*, 1986). A elasticidade e estabilidade mecânica da membrana eritrocitária é regulada pela interação 4.1 com a rede espectrina-actina e com proteínas de membrana tais como a banda 3, glicoforina C (GPC) e p55, uma proteína de membrana palmitoilada contendo um único domínio denominado PDZ. Os defeitos hereditários na proteína 4.1 resultam em eritrócitos com

estrutura alterada e com diminuição da estabilidade mecânica da membrana, manifestada clinicamente como anemia hemolítica (NICOLAS *et al.*, 2003).

FIGURA 7. COMPLEXOS DA PROTEÍNA 4.1 NO ERITRÓCITO



(A) A organização da proteína 4.1 junto ao citoesqueleto da membrana espectrina/actina ligam-se em conjunto para formar um complexo juncional que permite a interação da proteína 4.1 com as proteínas transmembranais. (B) Várias moléculas de 4.1R ligam-se ao oligômero curto de actina no complexo de junção, permitindo a interação da proteína 4.1 com as proteínas transmembranais específicas de membrana do eritrócito (receptor de citocinas Duffy, o complexo de transporte XK/Kell, CD44, o componente Rh, proteína adesiva Lu/BCAM e a glicoforina C). Por simplicidade, espectrina não é mostrada neste diagrama, mas estão associadas nesse complexo como demonstrado anteriormente.

FONTE: (BAINES *et al.*, 2014)

A evidência direta sobre o papel crucial da proteína 4.1 na regulação da estabilidade da membrana dos eritrócitos foi demonstrada em trabalhos nos quais a

deficiência desta proteína resultou em instabilidade da membrana, causando assim resistência do eritrócito ao cisalhamento. A restauração da estabilidade das membranas deficientes em proteína 4.1 foi obtida gradativamente através da adição crescente de proteínas 4.1 puras (TAKAKUWA *et al.*, 1986).

As análises de eritrócitos humanos, *in vitro*, deficientes em 4.1R revelam o conjunto complexo de proteínas de membrana que podem ligar-se a 4.1R (FIGURA 7B). Nas células deficientes em 4.1R quase todas as proteínas que possuem o domínio de ligação para proteína 4.1 são perdidas, incluindo o receptor de citocinas Duffy, o complexo de transporte XK / Kell, CD44, o componente Rh e a glicoforina C (SALOMAO *et al.*, 2008). No entanto, a banda 3, um trocador de íons, continua presente, embora o acesso de um anticorpo sensível à conformação se apresentou alterado (SALOMAO *et al.*, 2008), implicando que 4.1R é necessária para a conformação normal da banda 3. Além disso, as proteínas aducina e dematina, que proporcionam uma via adicional para interação com o trocador de íons (ANONG *et al.*, 2009) e, adicionalmente, interagem com o transportador de glucose, GLUT 1 (KHAN *et al.*, 2008), foram encontradas com uma estequiometria inferior nos complexos de ligação com actina nos eritrócitos deficientes de 4.1R. Assim, todos esses fatos resultam que a função principal de 4.1R é capturar proteínas de membrana durante a diferenciação celular e mantê-las em locais específicos junto aos filamentos curtos de actina no ponto de junção espectrina-actina (BAINES *et al.*, 2014).

3.6.4. Anquirina

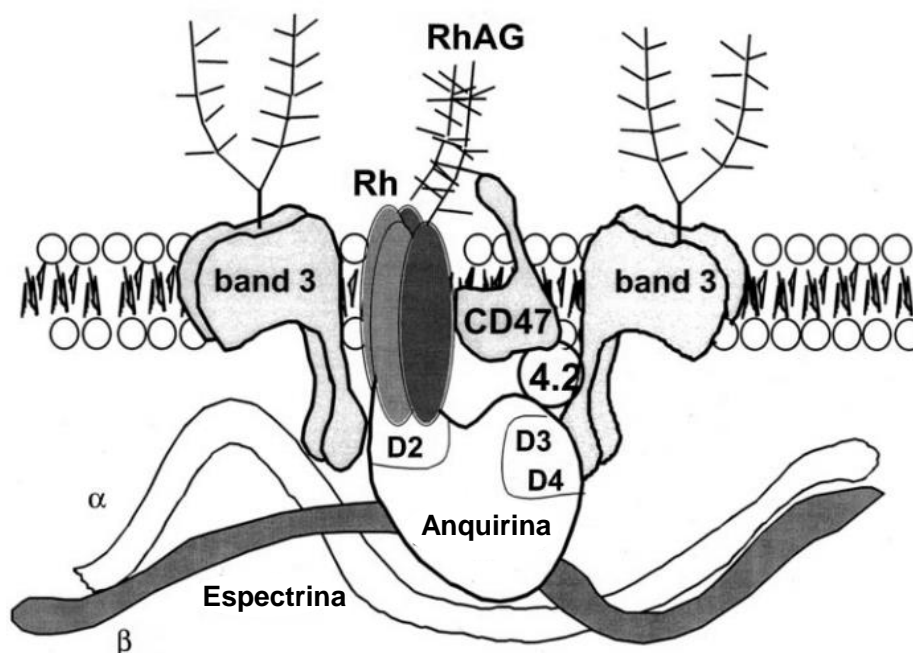
A anquirina nos mamíferos é expressa por uma família de gene que atualmente é subdividida em *Ank1*, *Ank2* e *Ank3*, as quais expressam as proteínas anquirina-R, anquirina-B e anquirina-G, respectivamente (BENNETT, V; BAINES, 2001), sendo apenas a anquirina-R expressa em células eritróides (NICOLAS *et al.*, 2003). Anquirina-R é uma fosfoproteína monomérica eritrocitária, com elevada massa molecular de 215.000 Da, e apresenta cerca de 10.000 cópias por eritrócito (BENNETT, V, 1985). A isoforma da proteína relacionada ao eritrócito tem como função ligar a espectrina (TYLER *et al.*, 1979; TYLER *et al.*, 1980) ao domínio citoplasmático da banda 3 (BENNETT, V.; STENBUCK, 1980). Anquirina também possui interação com os microtúbulos eritrócitários (BENNETT, V, 1985), mas esses estão presentes apenas na fase eritroblasto da eritropoiese e em eritrócitos primitivos fetais circulantes (VAN DEURS; BEHNKE, 1973). A associação da espectrina com

anquirina restringe a mobilidade lateral da banda 3 e de outras proteínas de membrana integrais de eritrócitos (FOWLER; BENNETT, 1978). Essa associação é essencial para a estrutura e estabilidade normal da membrana eritrocitária e podem ser alterada em certas condições patológicas (BENNETT, V.; STENBUCK, 1980).

A anquirina é uma proteína modular constituída por três domínios conservados entre membros da família: domínio de ligação à membrana NH₂-terminal, um domínio de ligação a espectrina de 62 kDa e um domínio de morte de 12 kDa, esse último recebeu esse nome pois foi primeiramente detectado em proteínas tais como Fas e o receptor do fator de necrose tumoral, que participam em vias de apoptose. Os domínios de ligação à membrana NH₂-terminal são compostos por 24 cópias de uma repetição de 33 resíduos conhecida como a repetição ANK que está envolvida no reconhecimento de proteínas. As 24 repetições ANK formam 4 subdomínios (D1, D2, D3, D4) (NICOLAS *et al.*, 2003), cada um compreendendo a unidade básica de dobramento de 6 repetições de 33 resíduos de aminoácidos (BENNETT, V; BAINES, 2001).

Estudos anteriores demonstraram que o subdomínio D2 da anquirina-R interage, simultaneamente, como mediador da ligação da espectrina a um conjunto diverso de proteínas que abrangem a membrana, tais como CD44 (ZHU; BOURGUIGNON, 2000) e banda 3 (MICHAELY; BENNETT, 1995). A anquirina também pode formar homocomplexos entre dois dímeros de banda 3 através de dois locais de ligação distintos, mas cooperativos (D2 e D3-D4) (MICHAELY; BENNETT, 1995). Nicolas e colaboradores (2003) demonstraram que o domínio citoplasmático C-terminal de Rh/RhAG liga-se ao subdomínio de repetição D2 do domínio de ligação à membrana NH₂-terminal da anquirina-R (NICOLAS *et al.*, 2003). Em concordância com estas propriedades da anquirina para formar homo e heterocomplexos entre proteínas de membrana, os autores propuseram um modelo de interação entre a banda 3, a anquirina e a proteína Rh/RhAG, no qual a anquirina-R pode ligar diretamente e simultaneamente à banda 3 e/ou à Rh/RhAG, por meio de seus domínios de repetição D3-D4 e/ou D2, respectivamente (FIGURA 8) (NICOLAS *et al.*, 2003).

FIGURA 8. MODELO ESQUEMÁTICO DAS INTERAÇÕES DA ANQUIRINA COM AS PROTEÍNAS INTEGRAIS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITO.



Os tetrameros Rh/RhAG ligam-se diretamente ao domínio D2 da anquirina. Os tetrameros da banda 3 estão diretamente acoplados aos domínios de ligação D2 e D3-D4 da anquirina. Nesse modelo também é demonstrado a potencial interação entre CD47 e proteína 4.2. No modelo proposto, o complexo Rh e a banda 3 estão associados a espectrina através da intermediação da anquirina. FONTE: (NICOLAS *et al.*, 2003).

3.6.5. Banda 3 ou trocador aniônico (AE1)

A banda 3 ou transportador aniônico (*Anion Exchanger 1*, AE1) é uma proteína integral de membrana, de massa molecular de aproximadamente 100.000 daltons e a mais abundante na membrana eritrocitária, com mais de 1 milhão de cópias por célula, compondo assim, mais de 50% de todas as proteínas integrais da membrana (STECK, 1978). Seus polipeptídeos estão associados em dímeros e tetrameros com domínios extracelulares, intramembranares e citoplasmáticos, sendo o domínio citoplasmático amino-terminal de 43 kDa, que interage com proteínas citoesqueléticas e enzimas glicolíticas (EBY; KIRTLEY, 1983), e um domínio de intramembranar carboxi-terminal de 55 kDa, responsável pelo transporte aniônico (VAN DEN AKKER *et al.*, 2010).

Dentre as funções da banda 3 está o transporte antiporte dos íons $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. O dióxido de carbono (CO_2), produto metabólico da respiração oxidativa, deve ser efetivamente eliminado do corpo humano. O CO_2 difunde-se das células para a corrente sanguínea e para os eritrócitos, onde é hidratado pela anidrase carbônica

citossólica (CA) (JENNINGS, 1989). O bicarbonato (HCO_3^-) resultante, impermeável à membrana, é exportado para o plasma pela banda 3, aumentando assim a capacidade sanguínea para transportar CO_2 . Ao retornar aos pulmões, o processo é invertido; HCO_3^- é transportado para o eritrócito em troca de Cl^- pela proteína transportadora de ânions e desidratado pela ação catalítica da CA, e o CO_2 resultante difunde através das membranas eritrocitárias e alveolares para ser expirado do organismo (STERLING *et al.*, 2001).

A proteína Banda 3 também desempenha um papel importante como um ponto de ligação entre a membrana lipídica e o citoesqueleto, interagindo o seu domínio citoplasmático com as proteínas do citoesqueleto. Na organização estrutural das proteínas da membrana do eritrócito, a banda 3 encontra-se em três complexos proteicos distintos: o Complexo da Anquirina, o Complexo Juncional, sendo esses dois complexos discutidos no item 3.6 desse trabalho e como complexos de banda dimérica de difusão livre. Tanto no complexo juncional quanto no complexo da anquirina, a banda 3 interage com outras proteínas globulares da membrana, incluindo a glicoforina A (GPA), RhAG e/ou Rh, CD47 e p55, entre outras (FIGURA 8) (VAN DEN AKKER *et al.*, 2010). Já foi discutido e demonstrado que a capacidade da banda 3 para ancorar o esqueleto da membrana na bicamada lipídica é um dos fatores essenciais na contribuição para a deformabilidade e estabilidade da membrana eritrocitária humana (VAN DORT *et al.*, 2001).

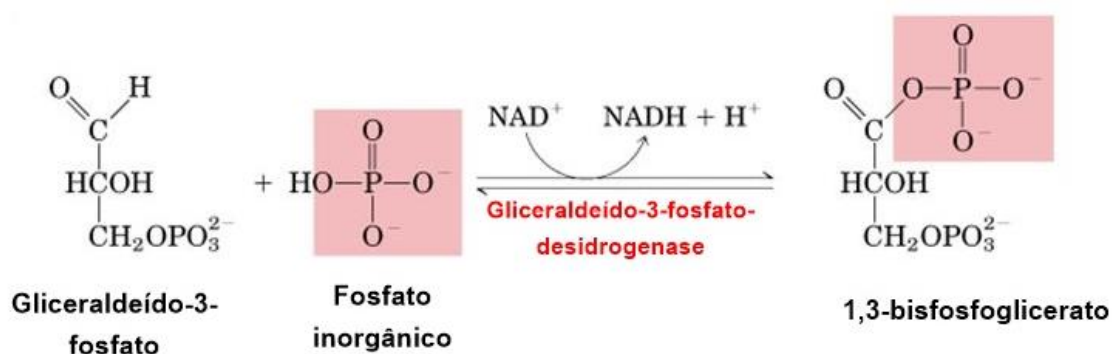
Além disso, a banda 3 dos eritrócitos humanos constitui o centro de organização do complexo de enzimas glicolíticas (GEs) na membrana de eritrócitos (CAMPANELLA *et al.*, 2005), possuindo sítio de ligação para G3PDH, aldolase, fosfofrutoquinase 1 (PFK) e, também para desoxihemoglobina (YU, J.; STECK, 1975; KLIMAN; STECK, 1980). A interação entre enzimas glicolíticas e Banda 3 ocorre especificamente entre o sítio ativo catiônico de caráter básico dessas enzimas e o seguimento amino terminal altamente aniônico da banda 3 (EBY; KIRTLEY, 1983). Essa interação eletrostática (MURTHY *et al.*, 1981) inibe a atividade catalítica das enzimas glicolíticas (TSAI *et al.*, 1982). A estruturação do complexo enzimas glicolíticas e banda 3 é regulada pelo estado de oxigenação da hemoglobina e pelo estado de fosforilação da banda 3, já discutido no item 3.6 desse trabalho (CAMPANELLA *et al.*, 2005; D'ALESSANDRO; ZOLLA, 2013).

3.6.6. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) é uma enzima tetramérica com subunidades de 34.000 a 38.000 Da. Cada subunidade pode ligar o cofator NAD(H) e a ligação pode ocorrer de forma cooperativa. As quatro subunidades da enzima são estruturalmente semelhantes e cada subunidade consiste essencialmente em dois domínios: o domínio N-terminal envolvido na ligação com o NAD(H) e o domínio C-terminal que contém os resíduos diretamente envolvidos no processo catalítico (FOTHERGILL-GILMORE; MICHELS, 1993). Além disso, apenas a forma tetramérica é ativa e a presença dos substratos promove a formação do tetrâmero (HARRIS; WATERS, 1976).

A G3PDH intervém no metabolismo da glicose de três maneiras distintas: pela via da glicólise, pelo ciclo de Krebs e pela via das pentose (FOTHERGILL-GILMORE; MICHELS, 1993). Nos eritrócitos maduros, por não conter mitocôndrias, apenas duas dessas vias são viáveis, a via glicolítica anaeróbica e a via da pentose (HANSON, 1981). Sendo assim, a G3PDH, uma enzima evolutivamente conservada que controla o fluxo de glicose através da via glicolítica de Embden-Meyerhof, catalisa a fosforilação oxidativa reversível de D-gliceraldeído-3-fosfato (DG3P) em 1,3-bifosfoglicerato (1,3DPG), utilizando o NAD(H) como cofator (FIGURA 9) (OLSEN *et al.*, 1976b). O metabolismo do carboidrato segue a via da glicólise anaeróbica resultando em duas moléculas de lactato e duas moléculas de ATP. O papel da G3PDH na via glicolítica foi amplamente estudado e elucidado (HARRIS; WATERS, 1976).

FIGURA 9. AÇÃO DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO-DESIDROGENASE NA VIA GLICOLÍTICA



A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) catalisa a oxidação da gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato. Nessa reação ocorre a fosforilação da gliceraldeído-3-fosfato e a transferência de elétrons para o NAD^+ , reduzindo-o a NADH.

Uma porcentagem das hexoses são fisiologicamente metabolizadas pela via das pentoses (PPP) (MAYES; BENDER, 2003). No entanto, quando há um desequilíbrio nas funções celulares e consequentemente a produção de espécies oxidativas, é notável que enzimas glicolíticas são inativadas, dentre elas a G3PDH, e a expressão de algumas enzimas envolvidas na via pentose fosfato (PPP) são induzidas. Enzimas da PPP são cruciais para manter a concentração citoplasmática de NADPH, que fornece o poder redox para conhecidos sistemas antioxidante (GAETANI *et al.*, 1989). As alterações no metabolismo dos carboidratos são centrais para a proteção celular contra as espécies reativas de oxigênio (EROs). Sendo assim, a inativação da G3PDH está diretamente envolvida no reencaminhamento do fluxo da glicose para a via das pentoses (RALSER *et al.*, 2007).

A sensibilidade da G3PDH a algumas reações de estresse celular já foi demonstrada, sendo alvo de ligação covalente de NAD^+ mediada por óxido nítrico (MCDONALD; MOSS, 1993) e radicais livres de oxigênio (MARIN *et al.*, 1995). Sob condições de estresse oxidativo celular, a G3PDH sofre modificações pós-traducionais, que podem determinar algumas de suas funções não-glicolíticas. Essas modificações reversíveis inativam a G3PDH, mecanismo que a célula dispõe para proteger a enzima glicolítica da inativação oxidativa irreversível, e reorientam o fluxo metabólico da glicólise para a via das pentoses fosfato, mantendo assim a relação $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. A exposição da célula à oxidantes pode induzir uma oxidação irreversível de resíduos de cisteína da G3PDH, favorecendo as ligações dissulfeto intermoleculares e a subsequente formação de agregados citosólicos de G3PDH. Esta proteína insolúvel pode em última análise, promover a disfunção celular e morte celular (TRISTAN *et al.*, 2011)

O sítio catalítico G3PDH é composto por resíduos de cisteína, aminoácidos sensíveis a oxiredução, que modulam a atividade metabólica de G3PDH de acordo com estresse oxidativo do ambiente. As EROs, geradas a partir de vários estímulos externos, causam modificações sulfidrílicas (-SH) oxidativas não enzimáticas nos resíduos de cisteína da enzima. Os produtos dessa oxidação reconhecidos na literatura são os ácidos sufídricos (Cys-SOH), sulfínicos (Cys-SO₂H), sulfônicos (Cys-SO₃H) e a ligação dissulfeto (Cys-SS-Cys) (JEONG *et al.*, 2011). Em situações que a célula está exposta a EROs, a enzima liga-se a porção citosólica da banda 3, tornando-se inativa (HILDEBRANDT *et al.*, 2015).

No estado fisiológico normal, 60-70% de toda a G3PDH está associada a membrana do eritrócito (OLSEN *et al.*, 1976a; STECK, 1978; KLIMAN; STECK, 1980) e outras estruturas celulares (KANT; STECK, 1973). O sítio de ligação da enzima a Banda 3 está contido num pólo de 40.000 Da (STECK, 1978). A ligação diminuiu com o aumento da força iônica e pH, sugerindo um forte componente eletrostático nessa associação (KANT; STECK, 1973; ROGALSKI *et al.*, 1989; MALLOZZI *et al.*, 1995; GALLI *et al.*, 1998). A G3PDH liga-se reversivelmente às membranas dos eritrócitos humanos por resíduos de aminoácidos específicos. Estes incluem tirosina 46 e treonina 150. A modificação covalente de lisinas 212 e 191 com fosfato de piridoxal resulta numa afinidade diminuída da enzima para membranas de eritrócitos, se o fosfato de piridoxal ligado a enzima não for reduzido antes da ligação. A redução do complexo piridoxal-fosfato-lisina inibe completamente a ligação da enzima a membrana dos eritrócito. Estes resultados do estudo de Eby (1983) sugerem um papel para as lisinas 212 e 191 na interação de gliceraldeído-3-fosfato com membrana de eritrócitos humanos (EBY; KIRTLEY, 1983).

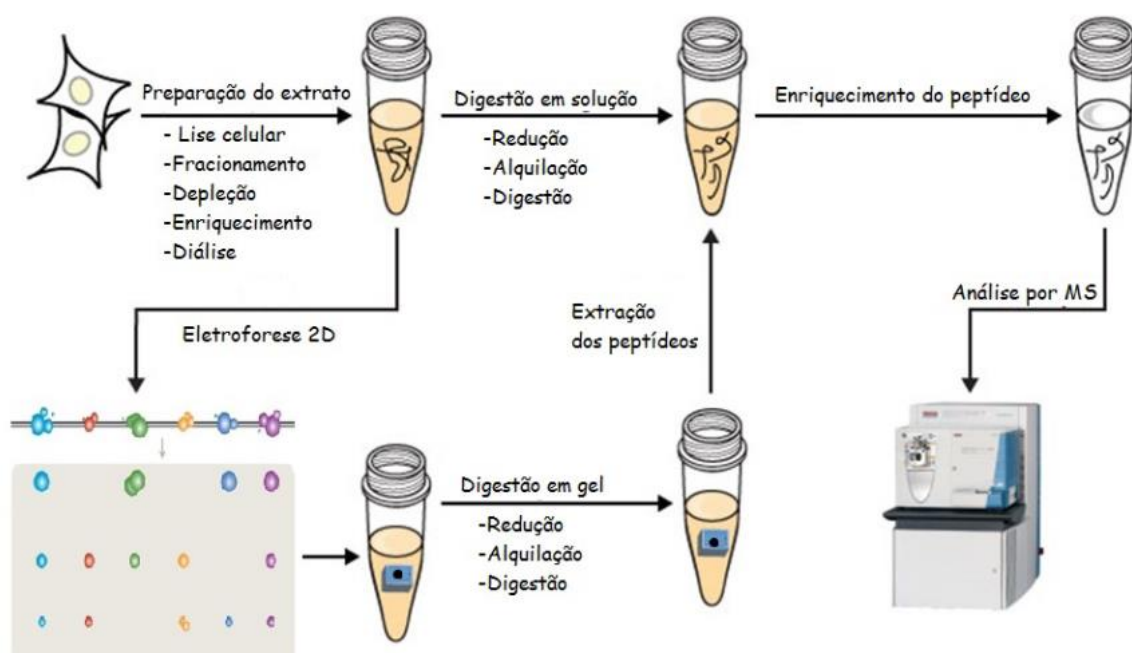
3.7. ANÁLISE PROTEÔMICA PARA OS ESTUDOS DOS ERITRÓCITOS

Proteoma caracteriza o conjunto de proteínas que estão sendo expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento. De forma distinta, a análise proteômica consiste no estudo do proteoma utilizando técnicas de separação e identificação, tais como eletroforese, cromatografia, espectrometria de massas e bioinformática (HEIN *et al.*, 2013). As proteínas, além de constituir parte da estrutura celular, desempenham a maior parte das funções fisiológicas das células, catalisando reações metabólicas, atuando na expressão gênica, estabelecendo também importantes alvos farmacológicos e biomarcadores de doenças (DAROFF; AMINOFF, 2014). A pesquisa qualitativa, quantitativa e a elucidação estrutural destas moléculas são fundamentais para a compreensão do funcionamento dos sistemas biológicos, bem como na aplicação destas para o desenvolvimento de novos métodos diagnóstico. O estudo do proteoma permite identificar as proteínas que estão sendo expressas em um determinado momento, quantificá-las e observar suas modificações pós-transducionais. Este tipo de estudo envolve etapas como: extração e tratamento da amostra, separação das proteínas e/ou peptídeos, espectrometria de massas e

análise dos dados usando ferramentas de bioinformática (AHRENS *et al.*, 2010; EMIDIO *et al.*, 2015).

Em uma das abordagens, as proteínas do extrato total são pré-fracionadas por eletroforese e então digeridas para em seguida serem analisadas por espectrômetro de massa. Alternativamente, na estratégia shotgun do tipo “bottom-up” digere-se o extrato total (FIGURA 10) e analisa-se o mesmo por cromatografia líquida diretamente acoplada ao espectrômetro de massas, para a identificação dos peptídeos da amostra. Dependendo do objetivo do estudo e das técnicas disponíveis, diferentes tipos de abordagens e modificações nas etapas citadas são necessárias (LIU *et al.*, 2002; YATES *et al.*, 2009; MALLICK; KUSTER, 2010; ZHANG, Y. *et al.*, 2013)

FIGURA 10. ETAPAS COMUMENTE SEGUIDAS EM UMA ANÁLISE PROTEÔMICA “BOTTOM-UP”.



Na análise proteômica, a célula é preparada, as proteínas são separadas, digeridas e analisadas no espectrômetro de massas. Em uma abordagem alternativa, a proteína não sofre separação, passando pela digestão e em seguida análise no espectrômetro de massas.

FONTE: Adaptado de (EMIDIO *et al.*, 2015)

Neste trabalho, o objetivo é analisar as proteínas do eritrócito quando submetido a uma hiperglicemia crônica, através da análise de amostras de DM1 e DM2, escolhendo-se a análise proteômica comparativa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue de pacientes com DM1 e DM2 foram coletadas durante os exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento aos pacientes do laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas-UFPR (HC-UFPR). Os dados antropométricos, clínicos e laboratoriais foram obtidos nos prontuários dos pacientes e através do serviço de informação hospitalar do HC-UFPR. As amostras de sangue dos indivíduos do grupo controle (não gestantes e sem diabetes) foram obtidas durante a coleta de sangue realizada no Laboratório Escola do Curso de Farmácia-UFPR para a realização do exame periódico dos funcionários do Departamento de Farmácia e Análises Clínicas. Todos os participantes assinaram o Temo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética (CAAE: 01038112.0.0000.0102).

O sangue total foi coletado em tubos à vácuo contendo o anticoagulante K₂EDTA (BD Vacutainer K₂EDTA; Becton, Dickinson and Co). Os tubos foram centrifugados por 20 (vinte) minutos, a 2000 g, a 4°C. Após a centrifugação, o plasma e a camada de leucócitos foram removidos e a massa de eritrócitos de aproximadamente 2mL foi lavada com 3 volumes de solução de lavagem (NaCl 0,9% e tampão de fosfato de sódio 5mM, pH 8,0) por 4 vezes. A cada lavagem, as amostras foram centrifugadas a 380 g por 10 minutos, a 4°C e em seguida congeladas a -80°C (DAVIS; BENNETT, 1990). As coletas e esses processamentos foram realizados até a obtenção do tamanho amostral a ser estudado em cada grupo. Os grupos foram separados de acordo com o tipo de DM (DM1 e DM2), os quais foram subdivididos com base no controle glicêmico dos pacientes avaliado pela quantificação de hemoglobina glicada, conforme apresentado na tabela a seguir (TABELA 2):

TABELA 2. CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA COLETA E ESTUDO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Amostras	Controle glicêmico	Quantificação de Hb1AC (%)	Tamanho amostral (N)
DM1	mau	≥ 7	10
DM1	bom	< 7	10
DM2	mau	≥ 7	10
DM2	bom	< 7	10
Indivíduos sem diabetes	bom	< 6	10

4.2. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS E DE MEMBRANA DOS ERITRÓCITOS.

Para a extração das proteínas citoplasmáticas e de membrana, a massa de eritrócitos de cada grupo foi descongelada, homogeneizada e *pools* das 10 amostras de cada grupo foram preparados e submetidos ao processo de extração de proteínas. Para efetivar o rompimento dos eritrócitos previamente congelados, 100 µL de *pool* eritrocitário de cada amostra e 300uL de solução hipotônica gelada (tampão fosfato de sódio 5mM e pH8,0 contendo EDTA 1mM e PMSF 1 mM) foram pipetados para microtubos de 1,5mL, homogeneizados por inversão e os microtubos foram mantidos em banho de gelo por 15 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 15000xg (11049 rpm) por 15 minutos, a 4º C. O sobrenadante obtido foi armazenado a -80º C para posterior pesquisa do perfil eletroforético das proteínas citoplasmáticas e o precipitado foi lavado por 5 vezes com a solução hipotônica até a obtenção de um sobrenadante límpido e um precipitado esbranquiçado, chamado de *ghost*, que seria a membrana plasmática do eritrócito e citoesqueleto associado (ZHANG, Q. *et al.*, 2008; BORZA *et al.*, 2009; ZHANG, Q. *et al.*, 2011).

4.3. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas citoplasmáticas e de membrana foi determinada pelo método de Bradford, utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). Foi realizado uma curva de calibração utilizando reativo comercial de Bradford Sigma, com limite de detecção de proteínas de 0,2 µg/µL (BRADFORD, 1976).

4.4.ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL DESNATURANTE (SDS-PAGE)

A separação das proteínas citoplasmáticas e de membrana foi realizada por eletroforese unidimensional desnaturante (SDS-PAGE) conforme a metodologia descrita por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Para cada condição estudada, foram aplicados no gel um volume que continha 80µg de proteínas, as quais foram previamente solubilizadas em tampão de amostra 5x (Tris-HCl pH 6,8 60mM, glicerol 25%, SDS 10%, β-mercaptoetanol 14,4mM, azul de bromofenol 0,1%) em volume final de 15 uL.

A corrida eletroforética para separação das proteínas de membrana foi realizada em gel de poliacrilamida 12%, a uma diferença de potencial de 25V, corrente elétrica de 15mA, durante 15 horas (*overnight*) e as bandas de proteínas foram reveladas com *PhastGel® Blue R (GE Healthcare)*. Para a separação das proteínas citoplasmáticas, a corrida em gel de poliacrilamida de 12% ocorreu a uma voltagem de 150V, amperagem de 400mA por aproximadamente uma hora e 30 minutos. As bandas também foram reveladas com *PhastGel® Blue R (GE Healthcare)*.

4.5.VISUALIZAÇÃO DOS GÉIS, CAPTURA DAS IMAGENS E DENSITOMETRIA

As imagens dos géis corados com *PhastGel® Blue R (GE Healthcare)* foram digitalizadas utilizando o fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia, Brasil). A análise densitométrica das bandas foi realizada através do programa *LabImage 1D* (Loccus Biotecnologia, Brasil).

As bandas dos géis também foram reveladas com o Kit Pro-Q Emerald 488 Glycoprotein Gel and Blot Stain (Invitrogen, USA) a fim de detectar possíveis proteínas que poderiam estar envolvidas no processo de glicação.

4.6.CLIVAGEM DAS PROTEÍNAS POR TRIPSINIZAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As bandas proteicas foram excisadas do gel, descoradas com acetonitrila (ACN) 50% (v/v), NH₄HCO₃ 25 mM, desidratadas em ACN 100% e secas em fluxo laminar. Os pedaços de gel foram embebidos com 10µL de tripsina Sigma (20 ng em NH₄HCO₃ 40 mM) e incubados em banho de gelo por 30 minutos. A digestão trípica ocorreu por 16-18 horas a 37 °C. O volume de 1µL dos peptídeos resultantes foram

co-cristalizados com 1 μ L da matriz ácido ciano-4-hidroxicinamínico (4HCCA) em ACN 50% (v/v), TFA 0,1% (v/v) (LAŠTOVIČKOVÁ *et al.*, 2009), homogeneizado e colocado sobre uma placa de aço específica do espectrômetro de massas MALDI-TOF (Bruker Daltonics). A placa com as amostras foi inserida no equipamento para a obtenção dos espectros m/z.

4.7. OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS ESPECTROS DE MASSA

Para a obtenção dos espectros m/z os seguintes parâmetros foram empregados: modo refletor positivo, voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 ns entre o pulso de *laser* e aplicação da voltagem e massa de aquisição entre 800 – 3200 Da. Os espectros de massa dos peptídeos trípticos (m/z), gerados com o emprego do *software FlexControl (Bruker Daltonics)*, foram analisados e tratados através do programa *FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics)*.

4.8. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A identificação de proteínas foi realizada na plataforma *Mascot* disponível no endereço eletrônico www.matrixscience.com. A plataforma *Mascot* foi alimentada com os seguintes parâmetros de busca: carga dos peptídeos protonados +1, peptídeos trípticos com uma possibilidade de perda de um sítio de clivagem tríptica, tolerância máxima permitida de erro na massa 200 ppm e oxidação da metionina como modificação variável das proteínas. A partir desses critérios, o *Mascot* gera a comparação por homologia de massa de peptídeo e sequência de aminoácidos em bancos de dados de proteínas não redundantes do *NCBI*.

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As comparações entre os dados dos parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos estudados foram realizadas pelo Teste de Tukey e as comparações entre os volumes relativos das bandas de proteínas foram realizadas pelo Teste “t” de Student. Uma probabilidade (P) inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises. O programa *Statistica para Windows 10.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK)* foi utilizado para as comparações estabelecidas.

4.10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ERITRÓCITOS

Após as coletas de sangue, 1mL de eritrócitos foi tratado com reagente de Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C) (GRAHAM JR *et al.*, 1965) e as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

5.RESULTADOS

As corridas eletroforéticas, as análises densitométricas e a identificação de proteínas foram realizadas separadamente para o grupo DM1 e DM2. Portanto, os resultados foram compilados para o grupo DM1 seguido pelo grupo DM2. Os resultados da análise eletroforética para as proteínas eritrocitárias, citosólicas dos grupos DM1 e DM2 e as imagens obtidas dos eritrócitos de pacientes com DM1, DM2 e indivíduos sem diabetes também serão apresentados.

5.1.CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS

Com base no valor de glicemia em jejum e de HbA1c estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2016), as amostras de sangue dos participantes da pesquisa foram divididas em três grupos: DM1, DM2 e o grupo controle (indivíduos sem diabetes). Os grupos DM1 e DM2 foram subdivididos de acordo com os valores de HbA1c que indicam bom controle glicêmico ($HbA1c < 7\%$) e mau controle glicêmico ($HbA1c \geq 7\%$).

Os valores dos dados antropométricos (peso, altura e IMC) entre os grupos e subgrupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Já a glicemia em jejum do grupo controle foi significativamente inferior em relação aos grupos DM1, DM2 e seus respectivos subgrupos, enquanto os valores de Hb1Ac para os grupos DM1 e DM2 com mau controle glicêmico foram significativamente superiores ($p > 0,05$) em relação aos grupos DM1 e DM2 com bom controle glicêmico e grupo controle (TABELA 3), conforme esperado.

TABELA 3. DADOS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS DM1, DM2 E CONTROLE

GRUPOS	DM1		DM2		CTRL [#]
Dados	HbA1c ≥7%	HbA1c <7%	HbA1c ≥7%	HbA1c <7%	HbA1c <7%
Controle glicêmico					
Peso (Kg)	67 ± 15 ^a	60 ± 9 ^a	67 ± 16 ^a	73 ± 12 ^a	65 ± 15 ^a
Altura (cm)	159 ± 7 ^b	161 ± 2 ^b	152 ± 8 ^b	160 ± 6 ^b	162 ± 8 ^b
IMC (kg/m ²) [*]	27 ± 6 ^c	23 ± 4 ^c	29 ± 5 ^c	29 ± 5 ^c	25 ± 7 ^c
Glicose (mg/dL) ^{**}	230 ± 181 ^d	209 ± 116 ^d	230 ± 112 ^d	115 ± 27 ^d	79 ± 6 ^e
HbA1c (%)	12,3 ± 1,9 ^f	6,2 ± 0,5 ^g	11,1 ± 1,1 ^f	5,9 ± 0,5 ^g	5,7 ± 0,4 ^g
Tempo (anos) ^{***}	17 ± 6 ^h	17 ± 2 ^h	14 ± 9 ^h	10 ± 9 ^h	-

Médias e desvios padrões seguidos por letras idênticas não são significativamente diferentes (p>0,05) de acordo com o teste Tukey para grupos desiguais.

[#] Grupo controle: indivíduos com diagnóstico negativo para DM

^{*} IMC = Índice de Massa Corpórea

^{**} Glicose em jejum de 8 horas

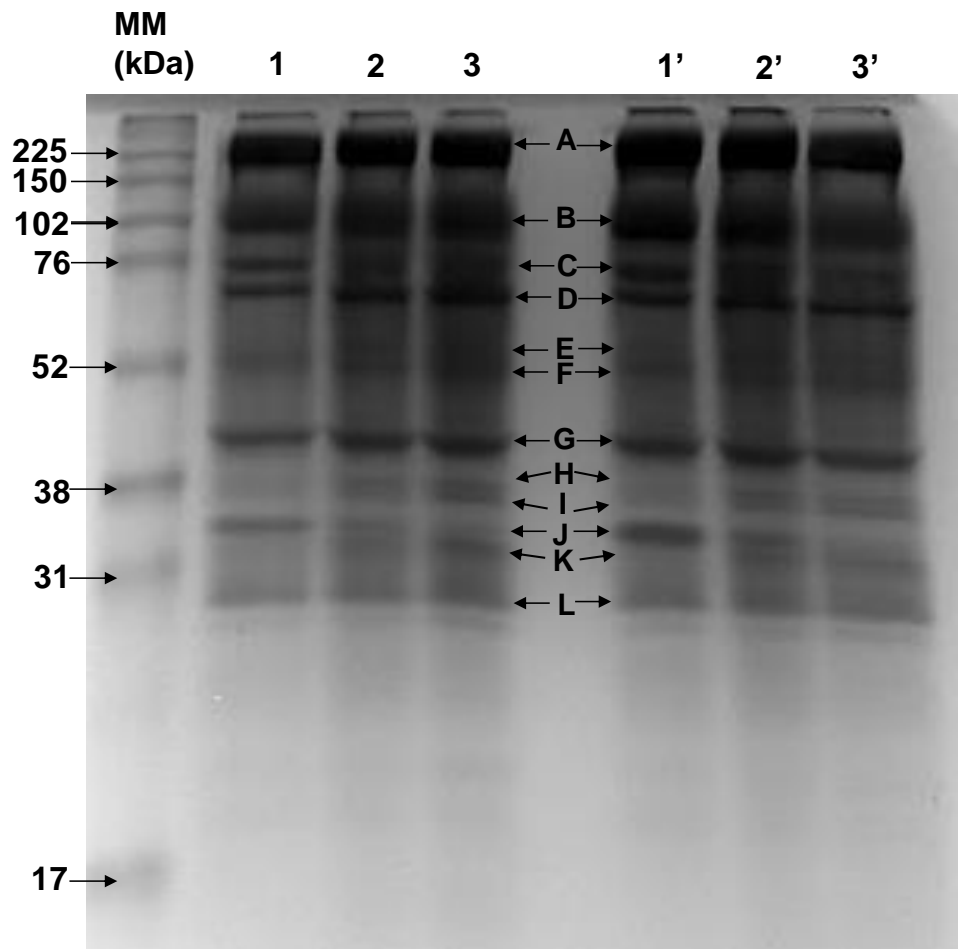
^{***} Tempo do diagnóstico da doença

(-) Indivíduos com diagnóstico negativo para DM

5.2. ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO *POOL* DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO GRUPO DM1 COM HEMOGLOBINA GLICADA ≥ 7%, <7% E GRUPO CONTROLE.

O perfil eletroforético (FIGURA 11) nas três condições testadas, DM1 com mau controle glicêmico (Linha 1 e 1'), DM1 com bom controle glicêmico (Linha 2 e 2') e o controle (Linha 3 e 3') apresentou 12 bandas proteicas.

FIGURA 11. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DO GRUPO DM1 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE



MM: padrões de massa molecular de proteínas. Linha 1, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$); Linha 2, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$); Linha 3, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de indivíduos sem DM. Linhas 1', 2' e 3' são repetições das respectivas condições previamente descritas. O gel representa triplicata técnica de géis independentes.

Visualmente, as bandas C, H, I, J e K apresentaram diferenças de intensidades nas três condições avaliadas. A banda C apresentou maior intensidade no grupo DM1 com mau controle glicêmico (Linha 1 e 1'); a banda H e I foram menos intensas no grupo DM1 com mau controle glicêmico (Linhas 1 e 1') em relação ao grupo com bom controle glicêmico (Linhas 2 e 2') e grupo controle (Linhas 3 e 3'). A banda J no grupo com bom controle glicêmico (Linhas 2 e 2') e grupo controle (Linha 3 e 3') apresentou menor intensidade em relação ao grupo com mau controle glicêmico (linhas 1 e 1'). A banda K, por outro lado, foi mais intensa no grupo controle (Linhas 3 e 3').

5.3. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DAS BANDAS PROTEICAS C, H, I, J E K DOS GRUPOS DM1 COM HEMOGLOBINA GLICADA ≥ 7%, <7% E GRUPO CONTROLE.

O parâmetro densitométrico empregado na quantificação das bandas foi o volume relativo percentual (vol.%) detectado a partir da relação entre o volume da banda analisada e o volume da banda normalizadora, que no presente estudo foi a banda A, a qual foi selecionada por ser mais intensa, volumosa e posicionada mais separadamente das demais bandas.

A média e desvio-padrão dos vol.% das bandas C, H, I, J e K (TABELAS 4) indicaram que os volumes relativos das bandas H e I do grupo controle foram maiores e estatisticamente significativos ($p>0,05$) quando comparados com os grupos DM1 com mau e bom controle glicêmico. O volume relativo da banda J do grupo DM1 com HbA1c $\geq 7\%$ foi maior e estatisticamente significativo em relação ao grupo com HbA1c $< 7\%$ e não foi detectável no grupo controle. Por fim, a banda K não foi detectada no grupo DM1 HB1Ac $\geq 7\%$, mas estava presente no grupo com bom controle glicêmico e grupo controle, sendo que o volume relativo no grupo controle foi maior e estatisticamente significativo em relação ao grupo com controle glicêmico.

TABELA 4. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DO GRUPO DM1 COM BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.

GRUPOS	DM1		CONTROLE
Bandas Proteicas	HbA1c $\geq 7\%$	HbA1c $< 7\%$	HbA1c $< 7\%$
CTRL *			
Banda C	44 \pm 4 ^a	41 \pm 5 ^a	45 \pm 8 ^a
Banda H	13 \pm 2 ^b	18 \pm 5 ^c	23 \pm 6 ^c
Banda I	13 \pm 2 ^d	17 \pm 3 ^e	22 \pm 4 ^e
Banda J	43 \pm 11 ^f	26 \pm 4 ^g	Ausente
Banda K	Ausente	30 \pm 7 ^h	23 \pm 7 ^h

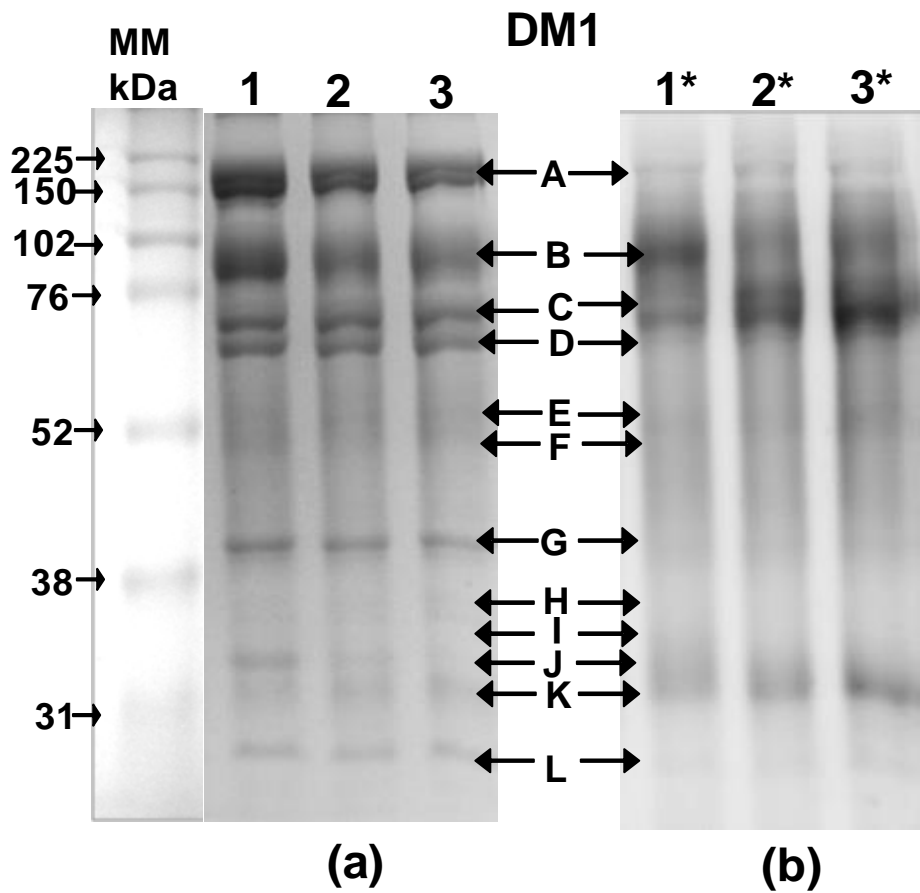
Os valores são médias e desvios-padrões dos resultados obtidos nas análises realizadas em triplicata de cada condição. Médias seguidas por letras idênticas não são significativamente diferentes ($p>0,05$) de acordo com o teste “T” Student.

CTRL*: controle glicêmico

5.4. PERFIL ELETROFORÉTICO DO POOL DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO GRUPO DM1 COM HEMOGLOBINA GLICADA $\geq 7\%$, $<7\%$ E GRUPO CONTROLE REVELADO COM PRO-Q EMERALD 488

Para verificar o nível de glicação das bandas de proteínas, géis de eletroforese (FIGURA 12) foram revelados com o corante específico Pro-q Emerald 288. As bandas E, F, G, H, I, J e K não foram detectadas nesses géis quando comparados com os géis revelados com *PhastGel® Blue R*. Já as bandas A, B, C, D, J e K e L foram visualizadas com a coloração específica.

FIGURA 12. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DO GRUPO DM1 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE REVELADO COM PRO-Q EMERALD 488.



MM: padrões de massa molecular de proteínas. (a) bandas de proteínas reveladas com *PhastGel® Blue R*: Linha 1, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$); Linha 2, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$); Linha 3, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de indivíduos sem DM. (b) bandas de proteínas reveladas com *Pro-Q Emerald 488*: Linha 1*, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$); Linha 2*, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$); Linha 3*, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de indivíduos sem DM. O gel representa duplicata de géis independentes.

5.5. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM1 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF

Todas as bandas visualizadas no gel de poliacrilamida 12%, independente de apresentarem diferenças densitométricas estatisticamente significativas entre os diferentes grupos, foram identificadas por espectrometria de massa do tipo MALDI/TOF (TABELA 5). As bandas designadas pela letra H foram identificadas como mistura das proteínas 4.1 e banda 3 em todos os grupos. A banda designada por I foi identificada como proteína 4.1 no grupo DM1 com bom controle glicêmico e grupo controle e como mistura de proteína 4.1 e banda 3, no grupo com mal controle glicêmico. Já a banda J, no grupo DM1 com mau controle glicêmico, foi identificada como mistura de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e banda 3, enquanto que no grupo com bom controle glicêmico foi identificada a banda 3. A banda K foi identificada como banda 3 no grupo DM1 com bom controle glicêmico e grupo controle.

TABELA 5. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM1 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF

BANDA/POOL	DM1 HbA1c≥7%	DM1 HbA1c<7%	CONTROLE
A	Espectrina	Espectrina	Espectrina
B	Banda 3	Banda 3	Banda 3
C	Anquirina/ Banda 3	Anquirina	Anquirina
D	Proteína 4.2	Proteína 4.2	Proteína 4.2
E	Banda 3	Banda 3	Banda 3
F	Banda 3	Banda 3	Banda 3
G	Actina	Actina/ Banda 3	Actina
H	Banda 3/Proteína 4.1	Banda 3/Proteína 4.1	Banda 3/Proteína 4.1
I	Banda 3/Proteína 4.1	Proteína 4.1	Proteína 4.1
J	*G3PDH/Banda 3	Banda 3	-----
K	-----	Banda 3	Banda 3
L	Banda 7/ Estomatina	Banda 7/ Estomatina	Banda 7/ Estomatina

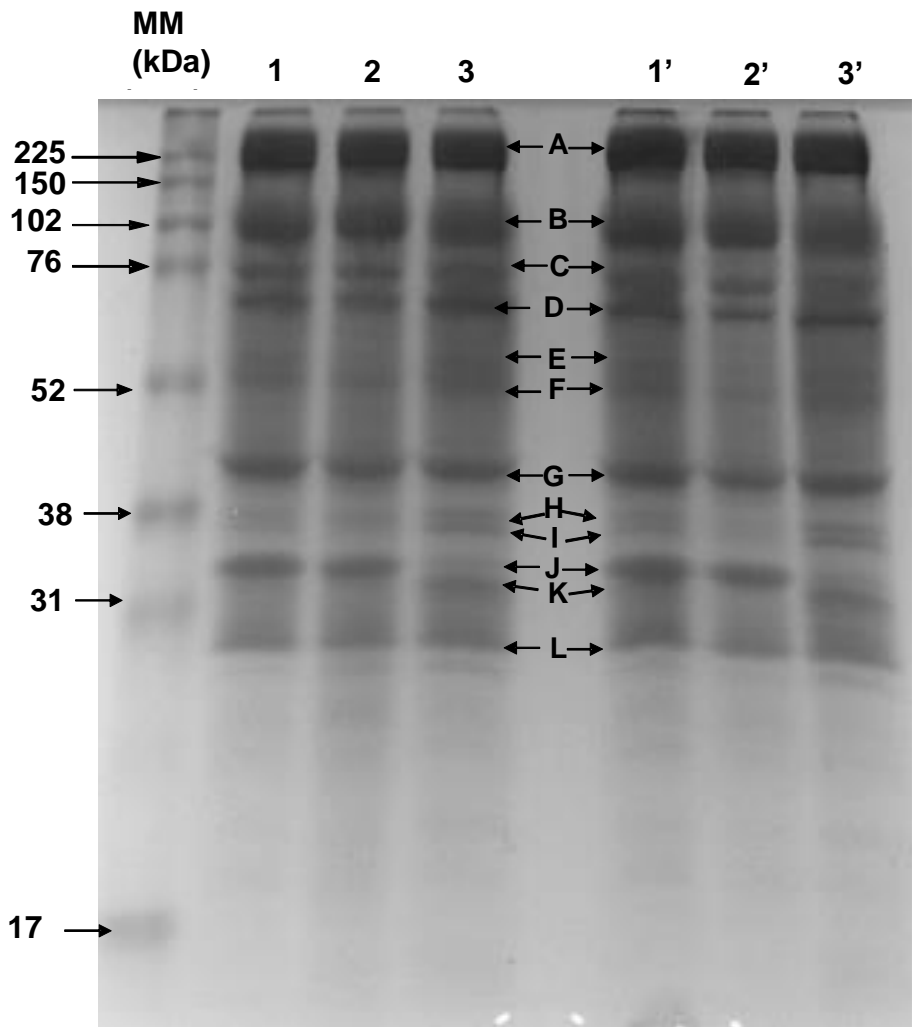
*G3PDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

5.6. ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO *POOL* DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO GRUPO DM2 COM HEMOGLOBINA GLICADA $\geq 7\%$, $<7\%$ E GRUPO CONTROLE

A análise eletroforética das três condições testadas, DM2 com mau controle glicêmico ($HbA1c \geq 7\%$), DM2 com bom controle glicêmico ($HbA1c < 7\%$) e o controle (FIGURA 13) revelou também 12 bandas, como nas amostras de DM1.

Visualmente foi possível observar que as bandas C, H, I, J e K apresentaram diferenças de intensidades nas três condições avaliadas. A banda C apresentou maior intensidade na condição de mau controle glicêmico (Linha 1 e 1') e bom controle glicêmico; a banda H e I foram menos intensas na condição de mau controle glicêmico (Linhas 1 e 1') e bom controle glicêmico (Linhas 2 e 2') em relação ao grupo controle (Linhas 3 e 3'). A bandas J no grupo com mau (Linhas 1 e 1') e bom controle glicêmico (Linhas 2 e 2') foram mais intensas quando comparadas com o grupo controle (Linha 3 e 3'). A banda K, por outro lado, foi mais intensa no grupo controle (Linhas 3 e 3') em relação ao grupo com mau (Linhas 1 e 1') e bom controle glicêmico (Linhas 2 e 2').

FIGURA 13. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DO GRUPO DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE



MM: padrões de massa molecular de proteínas. Linha 1, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$); Linha 2, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$); Linha 3, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de indivíduos sem DM. Linhas 1', 2' e 3' são repetições das respectivas condições previamente descritas. O gel representa triplicata técnica de géis independentes.

5.7. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DAS BANDAS PROTEICAS C, H, I, J E K DOS GRUPOS DM2 COM HEMOGLOBINA GLICADA $\geq 7\%$, $< 7\%$ E GRUPO CONTROLE.

Para as análises densitométricas das amostras de DM2, a banda A também foi empregada como normalizadora. A média e desvio-padrão dos vol.% das bandas C, H, I (TABELA 6) não foram estatisticamente significativas entre os grupos com mau e bom controle glicêmico e grupo controle. Os volumes relativos da banda J do grupo DM2 com HB1Ac $\geq 7\%$ e HB1Ac $< 7\%$ foram maiores e estatisticamente significativo em relação ao grupo controle e por fim, a banda K foi somente detectada na condição controle.

TABELA 6. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DO GRUPO DM2 COM BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.

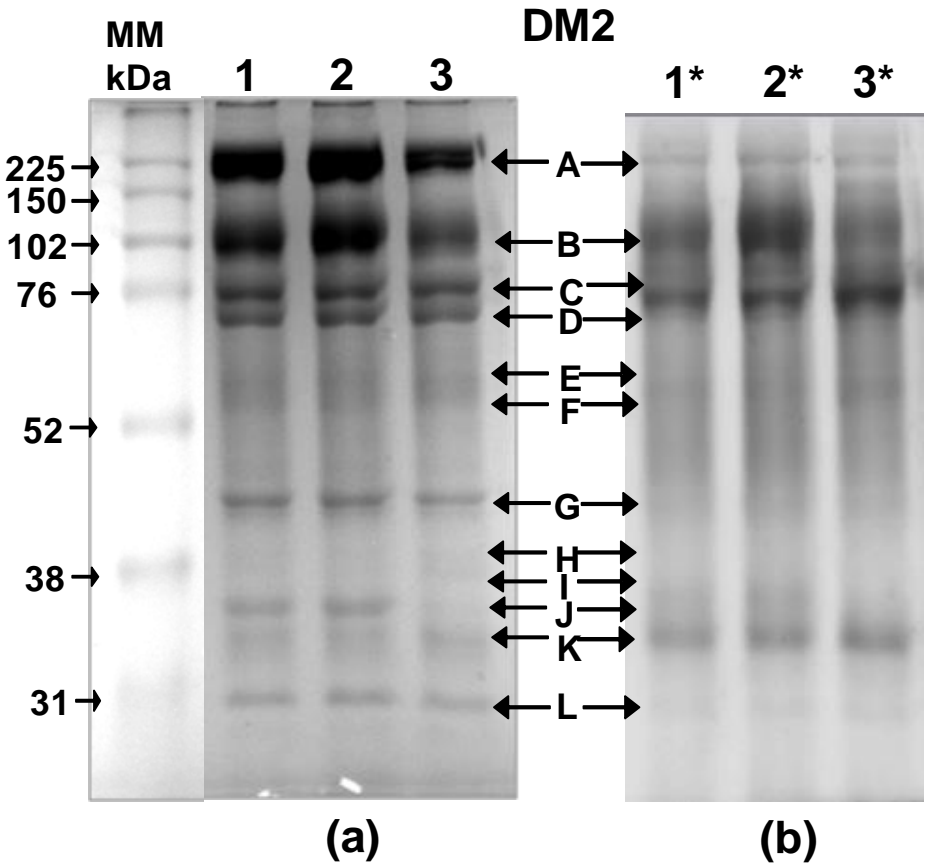
GRUPOS	DM2		CONTROLE
<div>Bandas</div> <div>CTRL*</div>	HbA1c ≥ 7%	HbA1c < 7%	HbA1c < 7%
Banda C	50 ± 11 ⁱ	40 ± 10 ⁱ	45 ± 8 ⁱ
Banda H	24 ± 8 ^j	23 ± 7 ^j	26 ± 7 ^j
Banda I	20 ± 6 ^k	17 ± 6 ^k	22 ± 4 ^k
Banda J	66 ± 23 ^m	56 ± 18 ^m	21 ± 10 ⁿ
Banda K	Ausente	Ausente	26 ± 4

Os valores são médias e desvios-padrões dos resultados obtidos nas análises realizadas em triplicata de cada condição. Médias seguidas por letras idênticas não são significativamente diferentes (p>0,05) de acordo com o teste “t” student.
CTRL*: controle glicêmico

5.8. PERFIL ELETROFORÉTICO DO *POOL* DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO GRUPO DM2 COM HEMOGLOBINA GLICADA ≥ 7%, <7% E GRUPO CONTROLE REVELADO COM PRO-Q EMERALD 488

Para verificar o nível de glicação das bandas de proteínas, géis de eletroforese (Figura 14) foram revelados com o corante específico Pro-Q Emerald 488. As bandas E, F, G, H, I não foram detectadas nesses géis quando comparados com os géis revelados com *PhastGel® Blue R*. Já as bandas A, B, C, D, J, K e L foram visualizadas com a coloração específica.

FIGURA 14. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DO GRUPO DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE REVELADO COM PRO-Q EMERALD 488.



MM: padrões de massa molecular de proteínas. (a) bandas de proteínas reveladas com *PhastGel® Blue R*: Linha 1, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$); Linha 2, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$); Linha 3, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de indivíduos sem DM. (b) bandas de proteínas reveladas com *Pro-Q Emerald 288*: Linha 1*, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$); Linha 2*, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$); Linha 3*, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de indivíduos sem DM. O gel representa duplicata de géis independentes.

5.9. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF:

As identificações das bandas proteicas também foram feitas para as bandas do grupo DM2. A banda H no grupo como mau controle glicêmico e bom controle glicêmico foi identificada como proteína 4.1 e banda 3 respectivamente e o grupo controle foi identificado como uma mistura de proteína 4.1 e banda 3. Para a banda I,

a identificação foi alcançada apenas para o grupo controle, sendo uma mistura de banda 3 e proteína 4.1. Por fim, a banda J foi identificada como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nos grupos com mau e bom controle glicêmico, enquanto a banda K foi detectada apenas no grupo controle e identificada como banda 3 (TABELA 7).

TABELA 7. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF.

BANDA/GRUPOS	DM2 HbA1c≥7%	DM2 HbA1c<7%	CONTROLE
A	Espectrina	Espectrina	Espectrina
B	Banda 3	Banda 3	Banda 3
C	Anquirina/ Banda 3	Anquirina	Anquirina
D	Proteína 4.2	Proteína 4.2	Proteína 4.2
E	Banda 3	Banda 3	Banda 3
F	Banda 3	Banda 3	Banda 3
G	Actina	Actina/ Banda 3	Actina
H	Proteína 4.1	Banda 3	Banda 3/Proteína 4.1
I	-----	-----	Banda 3/Proteína 4.1
J	*G3PDH	G3PDH	-----
K	-----	-----	Banda 3
L	Banda 7/ Estomatina	Banda 7/ Estomatina	Banda 7/ Estomatina

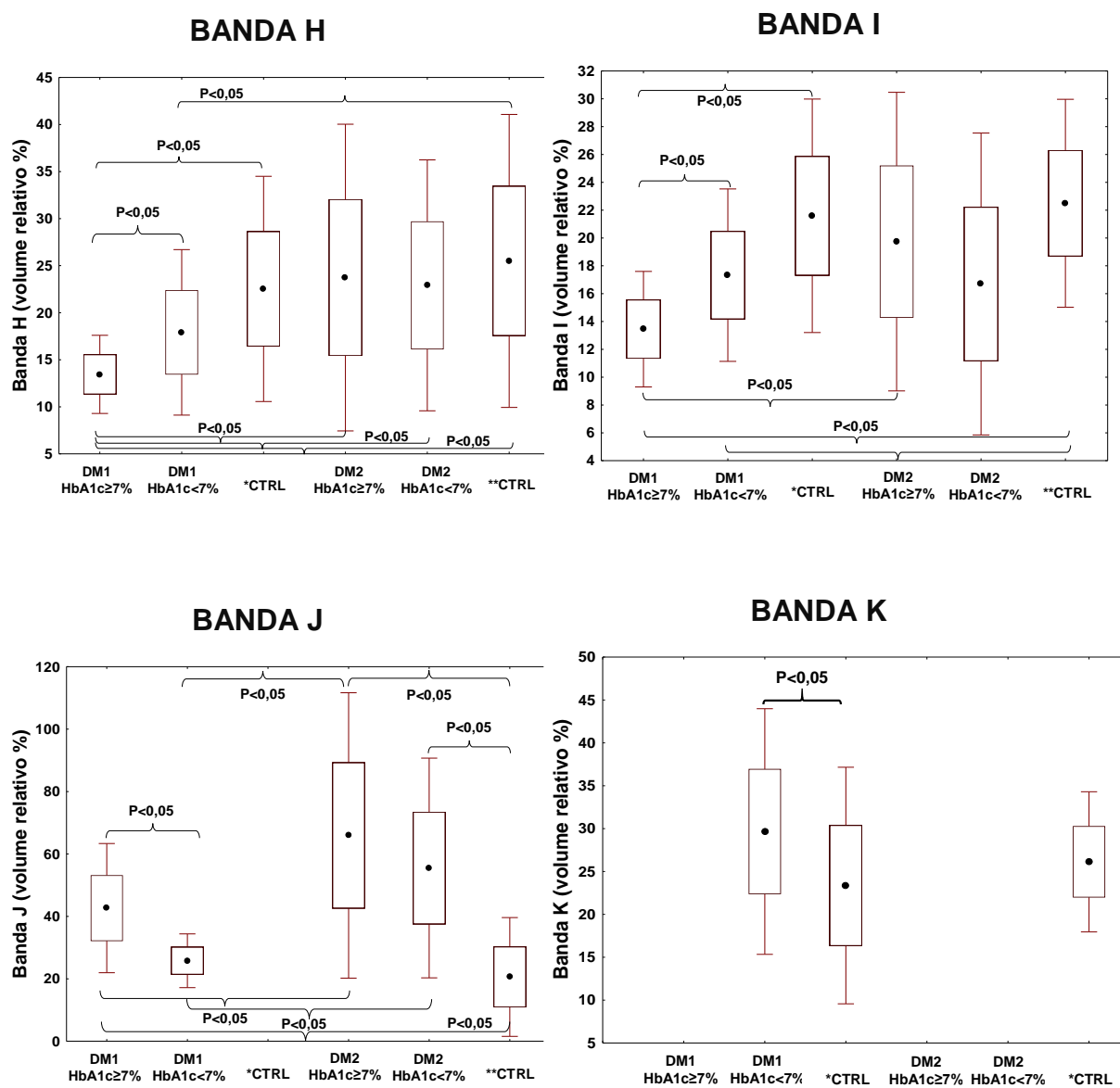
*G3PDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
(-----): sem identificação

5.10. COMPARAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DAS BANDAS H, I, J E K ENTRE OS GRUPOS DM1, DM2 E RESPECTIVOS SUBGRUPOS (BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO) E GRUPO CONTROLE

As bandas H, I, J e K mostraram diferenças densitométricas com significância estatística entre os subgrupos (bom e mal controle glicêmico e grupo controle) do grupo DM1 e do grupo DM2, bem como entre ambos os grupos (FIGURA 15). Ao avaliar os gráficos da banda H e banda I, observa-se que o grupo DM1 com mau controle glicêmico apresentou as bandas com menor densitometria, seguida pelas bandas DM1 com bom controle glicêmico e, os demais grupos apresentaram valores elevados e similares das bandas H e I. Em relação à banda J, tanto para o grupo DM1 quanto para o grupo DM2, foi possível observar que os valores de densitometria foram

decrecentes considerando os subgrupos mau e bom controle glicêmico e grupo controle. Por outro lado, para a banda K do grupo DM1, os valores de densitometria foram crescentes e para o grupo DM2, apenas foi possível detectar a banda K no grupo controle.

FIGURA 15. GRÁFICO DOS VOLUMES OBTIDOS NA DENSITOMETRIA POR CÁLCULO DE NORMALIZAÇÃO.

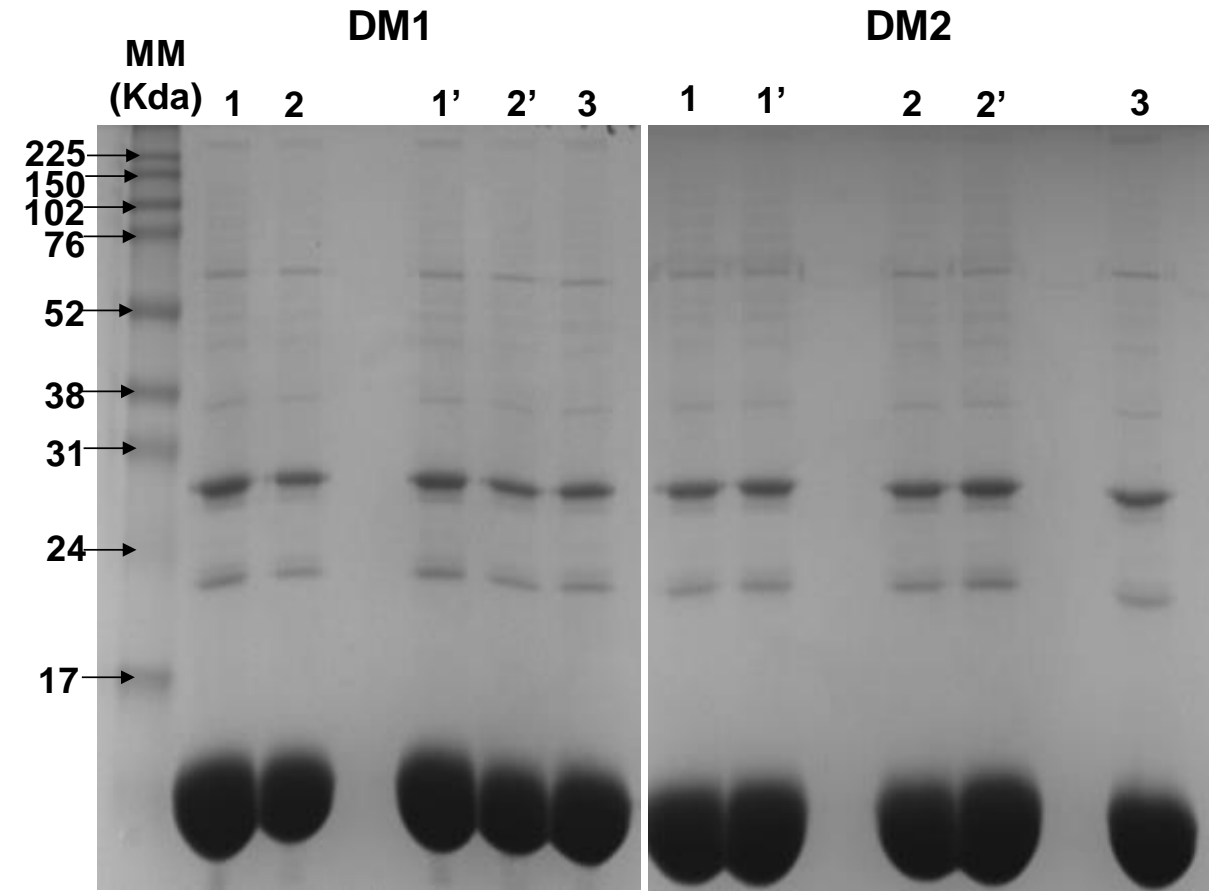


Os gráficos das bandas H-K, representam comparações dos grupos DM1 E DM2, com mau controle glicêmico (HbA1c≥7%), bom controle glicêmico (HbA1c<7%) e grupo sem diabetes (Controle). As comparações que possuem diferença estatisticamente significativa, com P<0,05, estão representadas na figura. Os círculos fechados indicam as médias, o quadrado 1-desvio padrão e as barras horizontais 2-desvios padrões. O valor de probabilidade (p) comparando as médias foi obtido com o teste de Mann-Whitney.

5.11. ANÁLISE COMPARATIVA DA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS DE ERITRÓCITOS ENTRE OS GRUPOS DE DM COM HbA1C ≥ 7% E HbA1C < 7%) E GRUPO CONTROLE

O perfil eletroforético das proteínas citosólicas (FIGURA 16) dos grupos DM1 e DM2 com mau controle glicêmico (Linhas 1 e 1'), com bom controle glicêmico (Linha 2 e 2') e o controle (Linha 3) não apresentou diferenças densitométricas quando comparados entre si. Portanto, a identificação das proteínas por MALDI-TOF não foi realizada.

FIGURA 16. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS DE ERITRÓCITOS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.



MM: padrões de massa molecular de proteínas. Linha 1, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com mau controle glicêmico (HbA1c ≥ 7%); Linha 2, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de pacientes DM1 com bom controle glicêmico (HbA1c < 7%); Linha 3, *pool* de proteínas de membrana de eritrócitos de indivíduos sem DM. Linhas 1', 2'' são repetições das respectivas condições previamente descritas. O gel representa triplicata técnica de géis independentes.

5.12. MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA DOS ERITRÓCITOS DE PACIENTES COM DM1, DM2 E SEM DIABETES

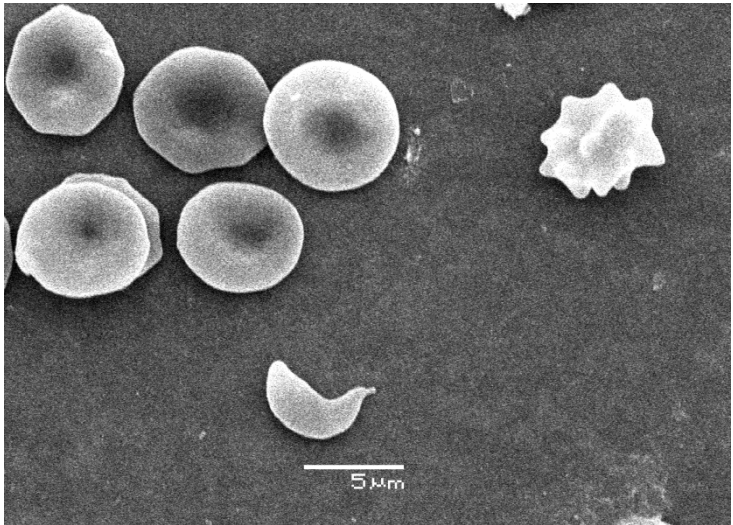
Trabalhos recentes, através da microscopia eletrônica, têm mostrado o efeito da hiperglicemia sobre eritrócito. Buys *et al*, 2013 mostrou por microscopia eletrônica de varredura, que as células vermelhas dos diabéticos apresentam uma morfologia e rugosidade diferente quando comparada com a morfologia da célula de paciente não diabético (BUYS *et al.*, 2013).

As imagens da microscopia de varredura eletrônica (FIGURA 17) revelaram modificações na morfologia dos eritrócitos nas três condições avaliadas. Nessas modificações, os eritrócitos apresentaram aspecto espiculado. Na amostra do paciente com DM2 foi possível visualizar uma maior quantidade desses eritrócitos disformes em relação ao grupo DM1 e controle.

FIGURA 17. MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA DOS ERITRÓCITOS DE PACIENTES COM DM1, DM2 E PACIENTE SEM DIABETES.

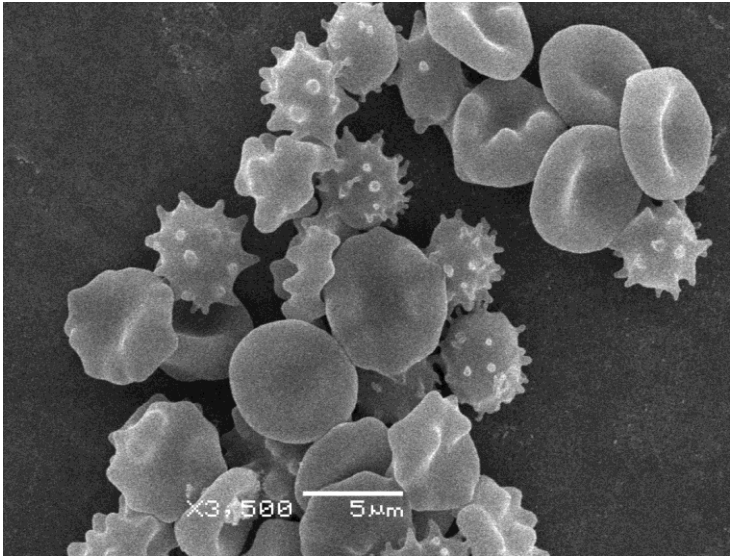
A)

Amostra de
um paciente
com DM1



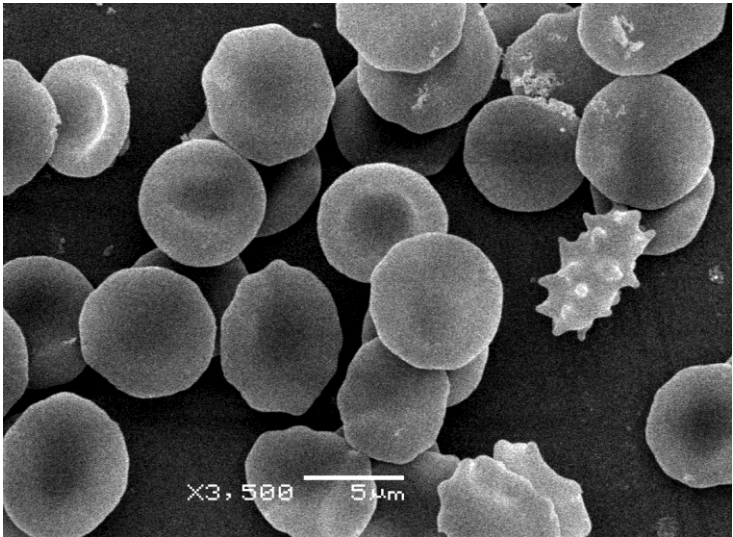
B)

Amostra de
um paciente
com DM2



C)

Amostra de
um paciente
sem diabetes



Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de eritrócitos de pacientes diabéticos Tipo 1, Tipo 2 e de paciente sem diabetes (normoglicêmicos).

6. DISCUSSÃO

6.1. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS

Os valores dos parâmetros peso, altura e IMC não foram estatisticamente diferentes entre os grupos estudados (TABELA 3). De acordo com ADA (2017), valor de IMC $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ é considerado fator de risco para diabetes. Portanto, ao avaliar a média do IMC igual 25 kg/m^2 , o grupo controle se enquadraria como grupo de risco.

Através dos valores de HbA1c, (TABELA 3) foi possível observar que independente do tipo de diabetes, existem pacientes com bom (HbA1c $< 7\%$) e mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$). Por outro lado, os valores de glicemia em jejum dos subgrupos dos grupos DM1 e DM2 não apresentaram diferença estatística significativa, exceto quando as glicemias dos grupos DM1 e DM2 foram comparadas com a glicemia do grupo controle. Além disso, os elevados valores de glicemia de jejum para todos os subgrupos de DM não corresponderam aos altos valores de Hb1Ac. Essas observações reforçam que o percentual de Hb1Ac representa a média ponderada das glicêmias médias diárias durante os últimos 2 a 3 meses (NETTO *et al.*, 2009), enquanto a glicemia em jejum reflete apenas uma única dosagem (MAKRIS; SPANOU, 2011).

6.2. ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DOS POOLS DE PROTEÍNAS ERITROCITÁRIAS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.

A análise proteômica será discutida em dois subitens: o perfil eletroforético das proteínas eritrocitárias e as diferenças estatisticamente significativas entre as porcentagens de volume relativo das proteínas dos grupos estudados.

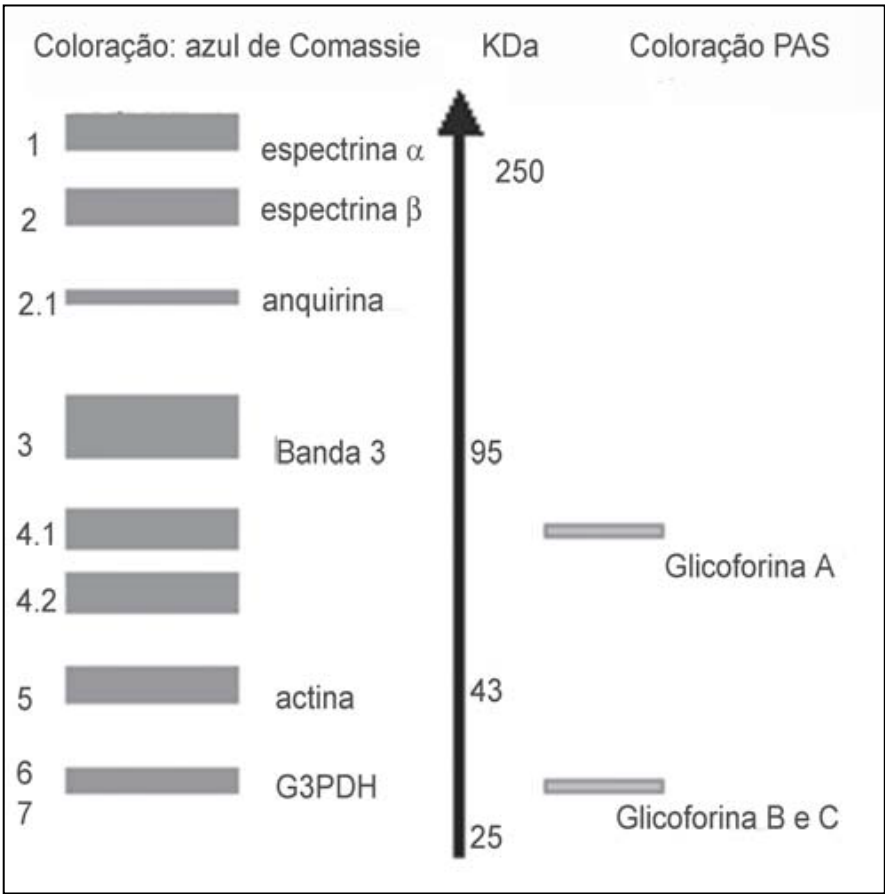
6.2.1. Perfis eletroforéticos das proteínas de membrana eritrocitária dos grupos DM1 e DM2 com bom e mau controle glicêmico e grupo controle.

No presente trabalho, a análise proteômica comparativa foi empregada em amostras eritrocitárias de pacientes com DM1, DM2, ambos subdivididos com bom e mau controle glicêmico e indivíduos sem diabetes (controle) (TABELA 2). A técnica

proteômica empregada foi a separação de proteínas por SDS-PAGE, seguida por tripsinização das bandas proteicas e identificação dos peptídeos gerados por espectrometria de massa do tipo MALDI TOF.

Para a separação das proteínas por eletroforese SDS-PAGE, diferentes condições de corrida (voltagem, porcentagem do gel de poliacrilamida, tempo de corrida, quantidade de proteína) foram testadas (dados não apresentados) a fim de obter a melhor separação das proteínas. Classicamente, as bandas de proteínas de membrana de eritrócito separadas em gel de poliacrilamida desnaturante receberam números de acordo com a velocidade de migração do gel (FAIRBANKS *et al.*, 1971) e, posteriormente passaram a ser identificadas, como mostrado na FIGURA 18 abaixo.

FIGURA 18. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ELETROFORESE DE EXTRATO DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA.



G3PDH = gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (banda 6); PAS = Ácido Periódico-Schiff (*Periodic Acid Schiff*), coloração específica para éster de ácido siálico.

FONTE: Adaptado de MURADOR et al, 2010

Ao comparar a FIGURA 18 com os resultados obtidos nas eletroforeses SDS-PAGE do presente estudo FIGURAS 11 e 13, foi possível constatar diferenças nas migrações de algumas proteínas, bem como o aparecimento da mesma proteína com diferentes massas moleculares. De acordo com o perfil eletroforético obtido para todos os grupos avaliados, a proteína denominada banda 3 foi detectada em diferentes bandas (102-76kDa) ou associada com outras proteínas como a proteína 4.1 (39-38KDa) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (35-36 kDa). Massas aparentes da banda 3 entre 188 a 25 kDa também foram detectadas em gel SDS-PAGE no estudo proteômico de membrana eritrocitária realizado por Pasini e colaboradores (2006) (PASINI, E. *et al.*, 2006). Já em separação através de eletroforese capilar, a banda 3 apresentou uma cabeça e cauda entre 183 e 86 KDa (LIN *et al.*, 2000). O aparecimento de três bandas da banda 3 em gel SDS-PAGE com massas de 60 kDa, 40 kDa e 24 kDa, a partir de *ghost* eritrocitário, foi justificado devido à ação catalítica de proteases associadas a membrana (TARONE *et al.*, 1979).

A proteína 4.1 também foi detectada em posição diferente no gel de poliacrilamida quando comparada com a proteína 4.1 da FIGURA 18. A massa molecular da proteína 4.1 é 97 kDa. No entanto, nos perfis eletroforéticos do presente estudo, a proteína 4.1 apresentou uma massa aparente próxima de 38 kDa, provavelmente devido à degradação proteolítica. Em estudo proteômico de membrana eritrocitária, a separação de proteínas, realizada por eletroforese bidimensional, também resultou em produtos de degradação da proteína 4.1, cuja massa molecular observada no gel foi inferior a 31 kDa (LOW *et al.*, 2002).

Durante o processo de extração das proteínas eritrocitárias, os inibidores de proteases PMSF e EDTA foram adicionados à solução de extração. O efeito da ação desses dois inibidores sobre proteases que degradam as proteínas de membrana eritrocitárias foi avaliado em eletroforese bidimensional e claramente o PMSF e EDTA impediram a degradação de proteínas nas mesmas concentrações empregadas no presente trabalho (OLIVIERI *et al.*, 2001). Pasini e colaboradores (2006) também concluíram que a detecção de proteínas eritrocitárias com massas moleculares inferiores aos valores esperados seriam produtos de degradação resultantes do processo de maturação dos eritrócitos (PASINI, E. *et al.*, 2006).

6.2.2. Diferenças na detecção das proteínas eritrocitárias, proteína 4.1 e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nas condições estudadas.

Diferentes abordagens de técnicas proteômicas tem sido empregadas para o estudo de eritrócitos humanos, a fim de aumentar a compreensão em relação à composição, organização e interação das proteínas da membrana plasmática, do citoesqueleto e citosol (D'ALESSANDRO *et al.*, 2010; PASINI, E. M. *et al.*, 2010a). Além disso, a proteômica comparativa tem sido empregada na detecção de possíveis diferenças de expressão de proteínas de eritrócitos de indivíduos saudáveis e indivíduos doentes com o propósito de identificar possíveis biomarcadores e alvos terapêuticos (PASINI, E. *et al.*, 2010b). No entanto, estudos proteômicos comparando eritrócitos em condição hiperglicêmica e normoglicêmica são escassos. No estudo proteômico realizado, a proteína 4.1 e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase apresentaram perfis densitométricos diferentes nas condições estabelecidas de estudo.

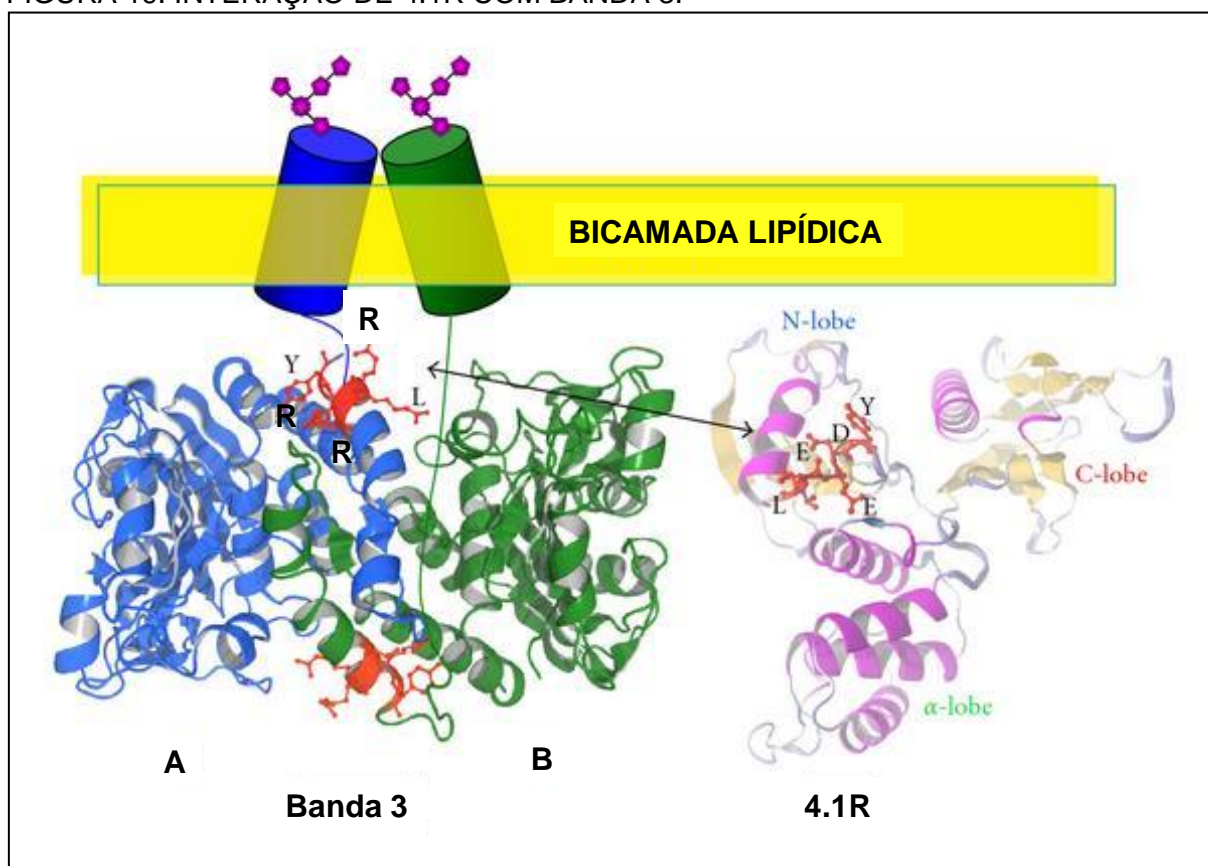
Um dos primeiros estudos proteômicos com membrana de eritrócitos de pacientes chineses com DM2 foi realizado por Jiang e colaboradores (2003), que objetivaram identificar outras proteínas, além do transportador GLUT 1 (HU *et al.*, 2000) que poderiam estar envolvidas no transporte reduzido de glicose para o citoplasma do eritrócito. Através de eletroforese bidimensional, 42 proteínas foram identificadas como sendo expressas diferencialmente nas amostras de pacientes com DM2 em relação ao grupo de indivíduos saudáveis, sendo que as proteínas flotina-1 (proteína integral de membrana) e arginase (proteína solúvel) foram 4,8 e 8,3 vezes mais expressas no grupo DM2 em relação ao grupo controle, enquanto a syntaxina 1C foi detectada 37 vezes menos expressa no grupo DM2 (JIANG *et al.*, 2003).

A expressão aumentada de flotilina-1 e arginase na membrana eritrocitária de pacientes DM2 foi evidenciada pelo recrutamento da arginase pela flotilina-1, resultando em aumento na atividade da arginase, a qual pode inibir a produção de óxido nítrico, uma vez que a arginase e a óxido nítrico sintase competem pelo mesmo substrato, a L-arginina (JIANG *et al.*, 2006). Por ser um vasodilatador endógeno e neurotransmissor, o óxido nítrico tem importantes funções como na manutenção da homeostasia circulatória e na sinalização nervosa. Portanto, a redução de óxido nítrico em pacientes diabéticos está relacionada com circulação sanguínea deficiente e neuropatia periférica (COHEN, 2005; HELTIANU; GUJA, 2012).

Proteína 4.1

No grupo DM1 com mau controle glicêmico, o volume da proteína 4.1 foi inferior e estatisticamente significante em relação ao grupo DM1 com bom controle glicêmico e grupo controle (TABELA 4). Cabe ressaltar que na identificação da proteína por MALDI TOF, o grupo DM1 com bom controle glicêmico e grupo controle apresentaram uma mistura de proteína 4.1 e banda 3 (TABELA 5). Uma sequência de resíduos de aminoácidos rica em arginina (IRRRY) no domínio citoplasmático da Banda 3 é o principal sítio de ligação para a proteína 4.1 do citoesqueleto (FIGURA 19) (JÖNS; DRENCKHAHN, 1992). Um estudo realizado com o peptídeo IRRRY sintético mostrou que a dissociação entre proteína 4.1 da Banda 3 promove acentuadas alterações nas propriedades mecânicas da membrana eritrocitária, como diminuição da deformabilidade da membrana e aumento na estabilidade mecânica da membrana (AN, XL *et al.*, 1996). A dissociação entre a proteína 4.1 e banda 3 promove uma forte interação entre a banda 3 e anquirina, que diminui a deformabilidade da membrana.

FIGURA 19. INTERAÇÃO DE 4.1R COM BANDA 3.



Banda 3 forma dímeros na membrana (A e B). A sequência LRRRY, localizada em uma α -hélice, medeia a interação entre os monômeros. A sequência LEEDY da proteína 4.1R, localizada em uma alça, interage com a sequência LRRRY da Banda 3.

FONTE: NUNOMURA et al, 2011.

A associação e dissociação da proteína 4.1R com outras proteínas eritrocitárias é regulada pela proteína C quinase (PKC) (MANNO *et al.*, 2005). Quando 4.1R está fosforilada, a afinidade com a banda 3, glicoforina C, espectrina e actina diminui, acarretando em uma menor estabilidade mecânica da membrana eritrocitária (MANNO *et al.*, 2005). Um dos fatores que interfere na atividade de PKC é a condição hiperglicêmica. Eritrócitos de indivíduos saudáveis expostos de forma aguda a uma elevada concentração de glicose (360 mg/dL) apresentaram níveis diminuídos de PKC na fração membranosa, bem como da sua atividade de fosforilação. No entanto, essas alterações correlacionaram-se com uma afinidade diminuída de PKC pelos seus substratos (proteína 4.1R e GLUT1) e consequente redução da deformabilidade nos eritrócitos (LIVSHITS *et al.*, 2012).

Diante das características da proteína 4.1 e da análise densitométrica do grupo DM1, sugere-se que as frações de membranas do grupo com bom controle glicêmico e grupo controle estão enriquecidas com a proteína 4.1R em relação ao grupo com mau controle glicêmico. Portanto, pode-se inferir que neste último grupo, a

deformabilidade dos eritrócitos pode estar reduzida. Em relação ao grupo DM2, essas diferenças não foram observadas (TABELA 6).

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

No grupo DM1 com mau controle glicêmico, o volume relativo da banda J foi maior e estatisticamente significativo em relação ao grupo DM1 com bom controle glicêmico (TABELA 4). A banda J foi identificada como uma mistura de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e banda 3 no grupo com mau controle glicêmico, apenas banda 3 no grupo com bom controle glicêmico e não foi identificada no grupo controle (TABELA 5). Diante desses resultados, pode-se inferir que a fração de membrana dos eritrócitos do grupo DM1 com mau controle glicêmico estava enriquecida com G3PDH.

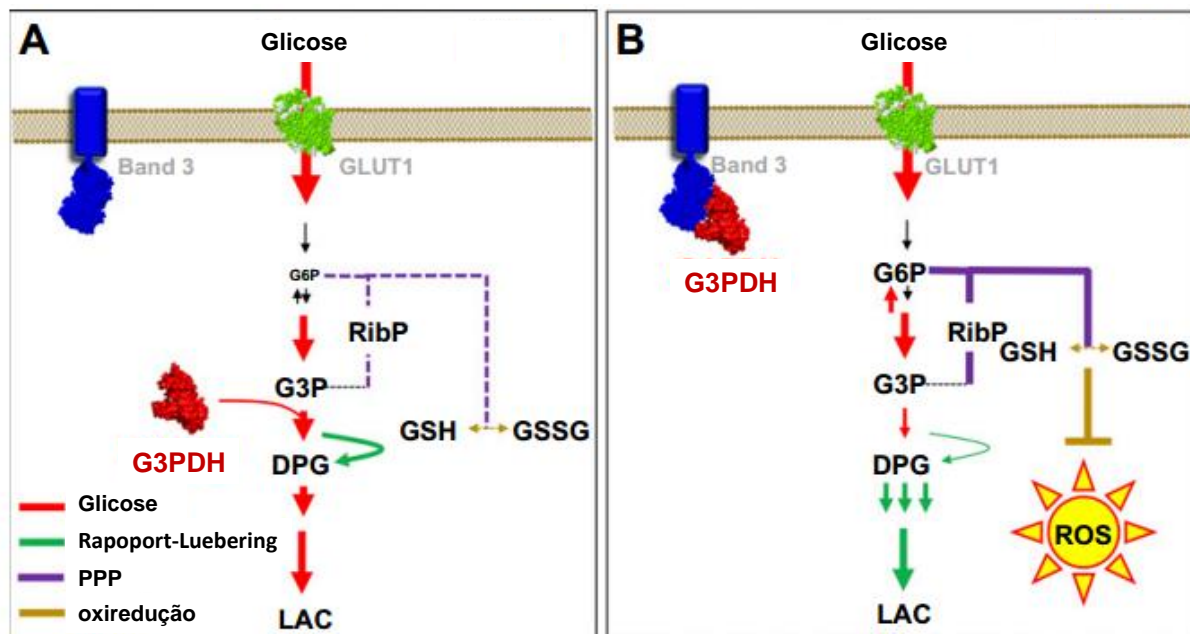
A banda K foi detectada apenas no grupo DM1 com bom controle glicêmico e grupo controle, sem diferença estatística significativa entre os valores de volume relativo de ambos os grupos (TABELA 4). No grupo com mau controle glicêmico, a banda K não foi detectada. Nos grupos com bom controle glicêmico e controle, a banda K foi identificada como banda 3 (TABELA5). Portanto, pode-se inferir, que independente da análise densitométrica, a proteína G3PDH foi detectada somente na condição de mau controle glicêmico, enquanto a banda 3 foi detectada nas condições de bom controle glicêmico e controle.

Em relação ao grupo DM2, os volumes relativos de G3PDH (banda J) tanto no subgrupo com mau controle glicêmico quanto no grupo com bom controle glicêmico não apresentaram diferença estatística (TABELA 6) e a enzima não foi detectada no grupo controle (TABELA7). Portanto, ao contrário do grupo DM1, as membranas eritrocitárias do grupo DM2 com mal e bom controle glicêmico estavam enriquecidas com G3PDH

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma enzima da via glicolítica que catalisa a conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato. funciona como um “interruptor metabólico” para equilibrar o estado redox das células (RALSER *et al.*, 2007). A G3PD e outras proteínas da via glicolítica (fosfrutoquinase e aldolase) tem atividade catalítica inibida quando estão ligadas à extremidade amino terminal da porção citosólica da banda 3. No entanto, quando o eritrócito está em condição de baixa oxigenação, deoxihemoglobinas ligam-se na extremidade aminoterminal da banda 3, deslocando as enzimas glicolíticas, que por sua vez, tornam-se ativas e aumentam o fluxo da glicose para via glicolítica. Por outro lado, em resposta a

condições elevadas de saturação de oxigênio e estresse oxidativo, essas enzimas ligam-se a porção citosólica da banda 3 e são inibidas (FIGURA 20). Como consequência, o fluxo de glicose é direcionada para a via das pentoses fosfato (PPP) a fim de promover o aumento de NADPH (RINALDUCCI *et al.*, 2015).

FIGURA 20. MODELO REPRESENTATIVO DA MODULAÇÃO METABÓLICA DEPENDENTE DE G3PDH EM ERITRÓCITOS HUMANOS.



O estresse oxidativo pode afetar a modulação metabólica dependente de oxigênio, promovendo a ligação de G3PDH a extremidade aminoterminal ou a outros sítios da banda 3, promovendo uma mudança metabólica de Embden-Meyerhof para a PPP a fim de produzir equivalentes redutores (NADPH) e restaurar o equilíbrio oxidoreduzidor. ROS: Espécies reativas de oxigênio (EROs).

FONTE: (REISZ *et al.*, 2016)

A hiperglicemia é uma condição pró-oxidante (VISTOLI *et al.*, 2013) e consequentemente afeta a atividade da G3PDH como foi mostrado em um estudo realizado com amostras de eritrócitos de pacientes com DM2, no qual a atividade catalítica da G3PDH dos eritrócitos desses pacientes foi significativamente menor em relação ao grupo de indivíduos sem diabetes. Provavelmente, esse resultado ocorreu devido à uma inibição reversível da G3PDH mediada por interação iônica com a banda 3 (SENHAJI *et al.*, 2015).

Outro estudo comparativo de eritrócitos de pacientes com DM1 e DM2 e pacientes sem diabetes mostrou o acúmulo de gliceraldeído-3-fosfato nos eritrócitos dos pacientes diabéticos com concomitante redução na atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. O excesso de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi convertido em diidroxiacetona-fosfato pela ação catalítica da triose-fosfato-isomerase, promovendo a formação de metilglioxal, o qual estava 25 vezes aumentado nos

eritrócitos de pacientes DM1 e 15 vezes aumentado nos eritrócitos dos pacientes DM2. No entanto, não houve correlação da atividade de G3PDH com a concentração de metilglioxal (FLEMING *et al.*, 2012). Por outro lado, uma inversa correlação entre as concentrações de metilglioxal e atividade de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi constatada em amostras de pacientes DM1 e DM2 (BEISSWENGER, P.; HOWELL; SMITH; *et al.*, 2003).

6.3. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE REVELADO COM PRO-Q EMERALD 488.

A hiperglicemia acarreta um desequilíbrio no sistema redox das células através da formação de produtos de glicoxidação, como os produtos finais de glicação avançada (AGEs) (VISTOLI *et al.*, 2013). A produção de AGEs decorre de uma reação de glicação não enzimática entre o grupo aldeído da glicose e o grupo amino de proteínas, que sob rearranjos moleculares geram produtos estáveis, conhecidos por produtos de Amadori. A hemoglobina glicada (Hb1AC) empregada no diagnóstico e controle glicêmico do DM é um exemplo de produto de Amadori (KAWAHITO *et al.*, 2009). Uma parcela dos produtos de Amadori sofrem reações químicas irreversíveis, formando os AGEs (EL DAYEM *et al.*, 2012), sendo os principais, a carboximetilisina (CML), carboxietilisina (CEL) e pentosidina (MEADE *et al.*, 2003). A formação de AGEs a partir do produto de Amadori ocorre em semanas a meses. Porém, uma rápida formação de AGEs pode ocorrer através da reação entre proteínas e compostos dicarbonílicos (metilglioxal, glioxal e 3-deoxiglucosona), que são produzidos a partir de intermediários da via glicolítica

A fim de certificar o nível de glicação das proteínas de membrana de eritrócitos, géis desnaturante de poliacrilamida foram revelados com um corante comercial para glicoproteínas, o PRO-Q Emerald 488. Esse corante reage com moléculas de glicose oxidadas previamente por ácido periódico. As bandas do grupo DM1 com mau controle glicêmico que emitiram fluorescência foram bandas B, D e K, no grupo com bom controle glicêmico foram as bandas C, D e K e no grupo controle, as bandas B, C, D e K foram detectadas, sendo que as duas últimas apresentaram maior fluorescência em relação aos subgrupos de DM1 (FIGURA 12). As bandas D e K são respectivamente a proteína 4.2 e banda 3. Ao avaliar o gel do grupo DM2 e respectivo grupo controle, observou-se que somente a banda D (proteína 4.2)

apresentou maior fluorescência em relação aos subgrupos de DM2 (FIGURA 14). Esses resultados aparentemente são contraditórios, pois era esperado que as proteínas dos grupos DM1 e DM2 emitissem mais fluorescência em relação ao grupo controle, mas ao considerar que PRO-Q Emerald reage com base de Schiff, a qual é formada no estágio inicial da glicação (SINGH *et al.*, 2014), pode-se inferir que as proteínas analisadas poderiam estar em etapas mais avançadas da glicação.

6.4. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE ERITRÓCITOS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE

As bandas de proteínas citosólicas dos grupos DM1, DM2 e grupo controle não apresentaram diferenças densitométricas quando comparadas (FIGURA 16). Na literatura, existem poucos trabalhos que comparam as proteínas citosólicas de eritrócitos de pacientes diabéticos e não diabéticos. Um desses estudos estabeleceu a relação do nível de expressão de proteínas eritrocitárias de pacientes com e sem diabetes e a partir dessa relação, foi constatado que poucas proteínas foram diferencialmente reguladas e essas proteínas seriam a anidrase carbônica (diabético: não diabético 0,51), glutatona transferase (0,79), GLUT1 (0,88), superóxido dismutase (1,21) e isocitrato desidrogenase (1,29) (WANG, Z. *et al.*, 2009).

Em outro trabalho, foi constatada que a expressão da enzima citosólica O-N-acetilglicosaminidase (O-GlcNAcase) foi significativamente aumentada em eritrócitos de indivíduos com pré-diabetes e diabetes com mau controle glicêmico em relação ao grupo controle (indivíduos sem diabetes). Os autores especularam que o aumento da expressão dessa enzima seria uma expressão adaptativa em função do aumento da O-GlcNAcilação (adição de N-acetilglicosaminas às proteínas) que ocorre a fim de estabilizar as proteínas em resposta à ação tóxica da hiperglicemia (PARK *et al.*, 2010).

6.5. ANÁLISE DA MICROSCOPIA POR VARREDURA DE ERITRÓCITOS DE PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 1, TIPO 2 E PACIENTES NÃO DIABÉTICOS.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido empregada na análise morfológica de eritrócitos de pacientes diabéticos. Imagens de eritrócitos de pacientes diabéticos obtidas por MEV revelaram formas celulares alongadas e lisas (BUYS *et*

al., 2013). Para uma avaliação mais detalhada, essas amostras foram analisadas por microscopia de força atômica, que indicou uma redução no tamanho, e da rugosidade de superfície dos eritrócitos dos pacientes diabéticos. Essas modificações na ultraestrutura do eritrócito foram associadas às oxidações de proteínas de membrana e citoesqueleto, inerentes à condição hiperglicêmica (BUYS *et al.*, 2013).

Em outro estudo sobre a ultraestrutura de eritrócitos de pacientes diabéticos não insulino dependentes, acantócitos e formas celulares em forma de copo foram identificadas duas alterações morfológicas foram observadas (STRAFACE *et al.*, 2002). Os autores justificaram que a presença de acantócitos é comum em condições de hiperinsulinemia e eritrócitos em forma de copo são frequentes em pacientes diabéticos com problemas cardiovasculares. Ainda nesse estudo, os pacientes foram tratados com o antioxidante N-acetilcisteína, que restaurou a morfologia discoide normal dos eritrócitos.

Conforme descrito no item 5.12, os eritrócitos das três condições estudadas apresentaram modificações morfológicas (membrana com espículas), sendo que nas amostras do paciente DM2, essas modificações foram mais frequentes em relação ao paciente DM1 e controle (FIGURA 17). No entanto, morfologia irregular dos eritrócitos também foi observada na condição não diabética. É de extrema importância ressaltar que o tempo e temperatura de transporte da amostra de sangue até o laboratório podem impactar na morfologia eritrocitária, como mostrado por Makhro e colaboradores (2016) que verificaram um aumento no número de equinócitos quando os tubos de sangue contendo EDTA foram transportados por 24 horas a 22°C. Porém quando o transporte ocorreu no mesmo período, mas a 4°C, os equinócitos foram formados esporadicamente (MAKHRO *et al.*, 2016). Em nosso caso, as amostras dos diferentes grupos estudados foram transportadas por períodos de tempo diferentes. O tempo de transporte foi menor para o grupo controle, seguido pelo grupo DM1 e o grupo DM2, o qual foi transportado dentro de 24 horas. Portanto, não podemos afirmar que as alterações morfológicas ocorreram puramente pela condição diabética.

6.CONCLUSÃO

Neste trabalho, proteínas de membrana e citosólicas dos *pools* de eritrócitos de pacientes com Diabetes mellitus do tipo 1, Diabetes mellitus do tipo 2, ambos os grupos subdivididos em bom e mau controle glicêmico e de indivíduos sem diabetes

(grupo controle) foram separadas por eletroforese SDS-PAGE. Os perfis eletroforéticos foram comparados entre os grupos estabelecidos e as bandas proteicas que apresentaram diferenças densitométricas foram identificadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. Diante do exposto, as principais conclusões foram:

- Os perfis eletroforéticos das proteínas de membrana dos eritrócitos dos grupos DM1, DM2 com bom e mau controle glicêmico e o grupo controle apresentaram 11 bandas proteicas e apenas 4 bandas proteicas (H, I, J e K) foram detectadas com diferenças no volume relativo, quando os grupos foram comparados;
- No grupo DM1, a banda proteica nomeada com a letra H foi identificada como uma mistura de banda 3 e proteína 4.1 nas condições de mau e bom controle glicêmico e controle, sendo que nas condições de bom controle glicêmico e controle, os volumes relativos dessa mistura de proteínas foram superiores e estatisticamente significativos ($18\% \pm 5$ e $23\% \pm 6$), respectivamente em relação ao grupo com mau controle glicêmico ($13\% \pm 2$);
- No grupo DM1, a banda proteica nomeada com a letra I foi identificada como uma mistura de banda 3 e proteína 4.1 na condição de mau controle glicêmico e nas condições de bom controle glicêmico e controle, apenas a proteína 4.1 foi identificada. Os volumes relativos $17\% \pm 3$ e $22\% \pm 4$ referentes às condições de bom controle glicêmico e controle, respectivamente, também foram estatisticamente superiores em relação ao mau controle glicêmico ($13\% \pm 2$);
- No grupo DM1, a banda J foi identificada como uma mistura de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e banda 3 na condição com mau controle glicêmico; já na condição de bom controle glicêmico apenas a banda 3 foi identificada e no controle não houve detecção de banda. O volume relativo da mistura de gliceraldeído-3-fosfato e banda 3 ($43\% \pm 11$) na condição de mau controle glicêmico foi estatisticamente superior em relação ao volume da banda 3 ($26\% \pm 4$) na condição de bom controle glicêmico;
- No grupo DM2, os volumes relativos das bandas H e I não apresentaram diferenças com significância estatística entre os grupos estudados. A banda

H foi identificada como Proteína 4.1, na condição de mau controle glicêmico. Enquanto nas condições de bom controle glicêmico e controle, as bandas foram identificadas como banda 3 e mistura de banda 3 e proteína 4.1;

- No grupo DM2, a banda J foi identificada como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase na condição de mau controle glicêmico e bom controle glicêmico. Em ambas as condições, não houve diferença significativamente estatística entre os volumes relativos da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e não houve detecção de banda proteica no grupo controle.

Diante dos resultados do presente trabalho é considerado os resultados já publicados referentes à G3PDH, pode-se afirmar que essa enzima é um potencial biomarcador para o monitoramento do estresse oxidativo decorrente de hiperglicemia e por consequência, para o monitoramento do aparecimento das complicações inerentes ao diabetes.

REFERÊNCIAS

- AHRENS, C. H. *et al.* Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. **Nature reviews Molecular cell biology**. v. 11, n.11, p. 789-801. 2010.
- AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 37 Suppl 1, p. S81-90. 2014.
- AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes-2016 Abridged for Primary Care Providers. **Clinical diabetes: a publication of the American Diabetes Association**. v. 34, n.1, p. 3. 2016.
- AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes-2017 Abridged for Primary Care Providers. **Clin Diabetes**. v. 35, n.1, p. 5-26. 2017.
- AN, X.; MOHANDAS, N. Disorders of red cell membrane. **Br J Haematol**. v. 141, n.3, p. 367-75. 2008.
- AN, X. *et al.* Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1. Functional implications in regulation of erythrocyte membrane mechanical properties. **J Biol Chem**. v. 271, n.52, p. 33187. 1996.
- ANONG, W. *et al.* Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. **Blood**. v. 114, n.9, p. 1904. 2009.
- AZZU, V.; BRAND, M. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. **Trends Biochem Sci**. v. 35, n.5, p. 298. 2010.
- BAINES, A.; LU, H.; BENNETT, P. The Protein 4.1 family: hub proteins in animals for organizing membrane proteins. **Biochim Biophys Acta**. v. 1838, n.2, p. 605. 2014.
- BALDWIN, J. Structure and function of haemoglobin. **Progress in biophysics and molecular biology**. v. 29, n.3, p. 225. 1975.
- BARASA, B.; SLIJPER, M. Challenges for red blood cell biomarker discovery through proteomics. **Biochim Biophys Acta**. v. 1844, n.5, p. 1003-10. 2014.
- BARRETO, O. C. O. P. Metabolismo do glóbulo vermelho-Revisão. **Arquivos Médicos do ABC**. v. p. 1978.
- BEISSWENGER, P. *et al.* Alpha-oxoaldehyde metabolism and diabetic complications. **Biochem Soc Trans**. v. 31, n.Pt 6, p. 1358. 2003.
- BEISSWENGER, P. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes. **Biochim Biophys Acta**. v. 1637, n.1, p. 98. 2003.
- BEISSWENGER, P. *et al.* Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 48, n.1, p. 198. 1999.

BEISSWENGER, P. *et al.* Increased collagen-linked pentosidine levels and advanced glycosylation end products in early diabetic nephropathy. **J Clin Invest.** v. 92, n.1, p. 212. 1993.

BEISSWENGER, P.; TOUCHETTE, A.; HOWELL, S. The effect of hyperglycaemia and diabetes on methylglyoxal and its detoxification pathways. In: *Diabetologia*, 1997,

BEISSWENGER, P. J. *et al.* Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. **Diabetes.** v. 44, n.7, p. 824-9. 1995.

BENESCH, R.; BENESCH, R. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 26, n.2, p. 162. 1967.

BENNETT, V. The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. **Annual review of biochemistry.** v. 54, n.1, p. 273-304. 1985.

BENNETT, V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes.** v. 988, n.1, p. 107-121. 1989.

BENNETT, V. Spectrin: a structural mediator between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. **Current opinion in cell biology.** v. 2, n.1, p. 51-56. 1990.

BENNETT, V.; BAINES, A. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. **Physiological reviews.** v. 81, n.3, p. 1353. 2001.

BENNETT, V.; STENBUCK, P. J. Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane. **J Biol Chem.** v. 255, n.13, p. 6424-32. 1980.

BORZA, T. *et al.* Atlantic cod (*Gadus morhua*) hemoglobin genes: multiplicity and polymorphism. **BMC Genet.** v. 10, p. 51. 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 72, n.1-2, p. 248-254. 1976.

BRANTON, D.; COHEN, C. M.; TYLER, J. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. **Cell.** v. 24, n.1, p. 24-32. 1981.

BRENNER, S.; KORN, E. Spectrin-actin interaction. Phosphorylated and dephosphorylated spectrin tetramer cross-link F-actin. **J Biol Chem.** v. 254, n.17, p. 8620. 1979.

BRODERICK, M.; WINDER, S. Spectrin, α -actinin, and dystrophin. **Advances in protein chemistry.** v. 70, p. 203-246. 2005.

BROWNLEE, M. Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. **Diabetes.** v. 43, n.6, p. 836-41. 1994.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. v. 414, n.6865, p. 813-20. 2001.

BUCHANAN, T. *et al.* What is gestational diabetes? **Diabetes Care**. v. 30, p. S105. 2007.

BUYS, A. V. *et al.* Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. **Cardiovasc Diabetol**. v. 12, n.1, p. 1. 2013.

CAMPANELLA, M. E.; CHU, H.; LOW, P. S. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 102, n.7, p. 2402. 2005.

CHUNG, S. *et al.* Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**. v. 14, n.8 Suppl 3, p. S233. 2003.

COHEN, R. Role of nitric oxide in diabetic complications. **Am J Ther**. v. 12, n.6, p. 499. 2005.

D'ALESSANDRO, A.; RIGHETTI, P.; ZOLLA, L. The red blood cell proteome and interactome: an update. **J Proteome Res**. v. 9, n.1, p. 144. 2010.

D'ALESSANDRO, A.; ZOLLA, L. Biochemistry of red cell aging in vivo and storage lesions. **Haematologica**. v. 7, p. 389-396. 2013.

DAROFF, R. B.; AMINOFF, M. J. **Encyclopedia of the neurological sciences**. Academic press, 2014.

DAVIS, L. H.; BENNETT, V. Mapping the binding sites of human erythrocyte ankyrin for the anion exchanger and spectrin. **Journal of Biological Chemistry**. v. 265, n.18, p. 10589-10596. 1990.

DCCT. Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. **Kidney Int**. v. 47, n.6, p. 1703-1720. 1995.

DE BOER, I. H. *et al.* Temporal Trends in the Prevalence of Diabetic Kidney Disease in the United States. **JAMA: the journal of the American Medical Association**. v. 305, n.24, p. 2532. 2011.

DEEDWANIA, P.; FONSECA, V. Diabetes, prediabetes, and cardiovascular risk: shifting the paradigm. **Am J Med**. v. 118, n.9, p. 939. 2005.

DU, X. *et al.* Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 97, n.22, p. 12222. 2000.

EBY, D.; KIRTLEY, M. E. Role of lysine residues in the binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to human erythrocyte membranes. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 116, n.2, p. 423-7. 1983.

EDER, P. S.; SOONG, C. J.; TAO, M. Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin. **Biochemistry.** v. 25, n.7, p. 1764-70. 1986.

EL DAYEM, S. *et al.* Malondialdehyde and Pentosidine in Young Type 1 Diabetic Patients. **Maced J Med Sci.** v. 5, n.4, p. 428-433. 2012.

EMIDIO, N. *et al.* Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU rev.** v. 41, n.3/4, p. 101-111. 2015.

ENGERMAN, R.; KERN, T.; LARSON, M. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. **Diabetologia.** v. 37, n.2, p. 141. 1994.

FAIRBANKS, G.; STECK, T.; WALLACH, D. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. **Biochemistry.** v. 10, n.13, p. 2606. 1971.

FLEMING, T. *et al.* Is diabetes an acquired disorder of reactive glucose metabolites and their intermediates? **Diabetologia.** v. 55, n.4, p. 1151-1155. 2012.

FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; MICHELS, P. A. M. Evolution of glycolysis. **Progress in biophysics and molecular biology.** v. 59, n.2, p. 105-235. 1993.

FOWLER, V.; BENNETT, V. Association of spectrin with its membrane attachment site restricts lateral mobility of human erythrocyte integral membrane proteins. **Journal of cellular biochemistry.** v. 8, n.2, p. 215-221. 1978.

GAETANI, G. *et al.* Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood.** v. 73, n.1, p. 334. 1989.

GALLI, F. *et al.* S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase decreases the enzyme affinity to the erythrocyte membrane. **Nitric Oxide.** v. 2, n.1, p. 17-27. 1998.

GHEZZI, P. Protein glutathionylation in health and disease. **Biochim Biophys Acta.** v. 1830, n.5, p. 3165. 2013.

GINSBERG, H. Insulin resistance and cardiovascular disease. **J Clin Invest.** v. 106, n.4, p. 453. 2000.

GRAHAM JR, R.; LUNDHOLM, U.; KARNOVSKY, M. CYTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF PEROXIDASE ACTIVITY WITH 3-AMINO-9-ETHYLCARBAZOLE. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society.** v. 13, p. 150. 1965.

GROEN, R. *et al.* Morphology of the human internal vertebral venous plexus: a cadaver study after latex injection in the 21-25-week fetus. **Clinical Anatomy**. v. 18, n.6, p. 397-403. 2005.

HALLER, M.; ATKINSON, M.; SCHATZ, D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. **Pediatr Clin North Am**. v. 52, n.6, p. 1553. 2005.

HANSON, R. Glycolysis and gluconeogenesis. **Biochemical Education**. v. 9, n.3, p. 89-91. 1981.

HARRIS, J. I.; WATERS, M. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. **The enzymes**. v. 13, p. 1-49. 1976.

HEIN, M. Y. *et al.* Proteomic analysis of cellular systems. In. **Handbook of Systems Biology: Concepts and Insights**: Academic Press, 2013. p.3-25.

HELLMAN, B. *et al.* The pancreatic beta-cell recognition of insulin secretagogues. Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone. **Arch Biochem Biophys**. v. 162, n.2, p. 448. 1974.

HELTIANU, C.; GUJA, C. Role of nitric oxide synthase family in diabetic neuropathy. **J Diabetes Metab**. v. 1, n.S5, p. 002. 2012.

HILDEBRANDT, T. *et al.* Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub? **Biol Chem**. v. 396, n.5, p. 523-37. 2015.

HORAL, M. *et al.* Activation of the hexosamine pathway causes oxidative stress and abnormal embryo gene expression: involvement in diabetic teratogenesis. **Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology**. v. 70, n.8, p. 519. 2004.

HU, X. *et al.* The abnormality of glucose transporter in the erythrocyte membrane of Chinese type 2 diabetic patients. **Biochim Biophys Acta**. v. 1466, n.1-2, p. 306. 2000.

INOGUCHI, T. *et al.* Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 89, n.22, p. 11059. 1992.

INTERNATIONAL-DIABETES-FEDERATION, A. International Diabetes Federation, 2015. **Available from:[Last accessed: 04 de novembro de 2016]**. v. Seventh Edithion, p. 2015.

JENNINGS, M. Structure and function of the red blood cell anion transport protein. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**. v. 18, p. 397. 1989.

JEONG, J. *et al.* Novel oxidative modifications in redox-active cysteine residues. **Molecular & cellular proteomics: MCP**. v. 10, n.3, p. M110. 000513. 2011.

JIANG, M. *et al.* Arginase-flotillin interaction brings arginase to red blood cell membrane. **FEBS letters**. v. 580, n.28-29, p. 6561-6564. 2006.

JIANG, M. *et al.* Protein disregulation in red blood cell membranes of type 2 diabetic patients. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 309, n.1, p. 196-200. 2003.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology.** v. 295, n.4, p. C849-C868. 2008.

JÖNS, T.; DRENCKHAHN, D. Identification of the binding interface involved in linkage of cytoskeletal protein 4.1 to the erythrocyte anion exchanger. **The EMBO Journal.** v. 11, n.8, p. 2863. 1992.

KADONAGA, J. *et al.* Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. **Science (New York, NY).** v. 242, n.4885, p. 1566. 1988.

KANNEL, W.; MCGEE, D. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. **Diabetes Care.** v. 2, n.2, p. 120. 1979.

KANT, J.; STECK, T. Specificity in the association of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with isolated human erythrocyte membranes. **J Biol Chem.** v. 248, n.24, p. 8457. 1973.

KAWAHITO, S.; KITAHATA, H.; OSHITA, S. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. **World journal of gastroenterology.** v. 15, n.33, p. 4137. 2009.

KHAN, A. *et al.* Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. **J Biol Chem.** v. 283, n.21, p. 14600. 2008.

KIM, C.; NEWTON, K.; KNOPP, R. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetes Care.** v. 25, n.10, p. 1862. 2002.

KIM, H.; GREENBURG, A. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status. **Artificial organs.** v. 28, n.9, p. 813. 2004.

KLEIN, R.; KLEIN, B.; MOSS, S. Visual impairment in diabetes. **Ophthalmology.** v. 91, n.1, p. 1. 1984.

KLIMAN, H.; STECK, T. Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the human red cell membrane. A kinetic analysis. **J Biol Chem.** v. 255, n.13, p. 6314. 1980.

KNECHT, K.; FEATHER, M.; BAYNES, J. Detection of 3-deoxyfructose and 3-deoxyglucosone in human urine and plasma: evidence for intermediate stages of the Maillard reaction in vivo. **Arch Biochem Biophys.** v. 294, n.1, p. 130. 1992.

KOYA, D.; KING, G. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes.** v. 47, n.6, p. 859. 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, p. 680-685. 1970.

LAŠTOVIČKOVÁ, M.; CHMELIK, J.; BOBALOVA, J. The combination of simple MALDI matrices for the improvement of intact glycoproteins and glycans analysis. **International Journal of Mass Spectrometry**. v. 281, n.1, p. 82-88. 2009.

LIN, C. *et al.* Capillary gel electrophoresis: separation of major erythrocyte membrane proteins. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**. v. 742, n.2, p. 411. 2000.

LIU, H.; LIN, D.; YATES 3RD, J. Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era. **BioTechniques**. v. 32, n.4, p. 898, 900, 902 passim. 2002.

LIVSHITS, L. *et al.* Effect of short-term hyperglycemia on protein kinase C alpha activation in human erythrocytes. **The review of diabetic studies: RDS**. v. 9, n.2-3, p. 94. 2012.

LOW, T.; SEOW, T.; CHUNG, M. Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**. v. 2, n.9, p. 1229. 2002.

LOWELL, B.; SHULMAN, G. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science (New York, NY)**. v. 307, n.5708, p. 384. 2005.

MAKHRO, A. *et al.* Red Cell Properties after Different Modes of Blood Transportation. **Frontiers in physiology**. v. 7, p. 288. 2016.

MAKRIS, K.; SPANOU, L. Is there a relationship between mean blood glucose and glycated hemoglobin? **J Diabetes Sci Technol**. v. 5, n.6, p. 1572. 2011.

MALLICK, P.; KUSTER, B. Proteomics: a pragmatic perspective. **Nature biotechnology**. v. 28, n.7, p. 695. 2010.

MALLOZZI, C.; DI STASI, A. M.; MINETTI, M. Free radicals induce reversible membrane-cytoplasm translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes. **Arch Biochem Biophys**. v. 321, n.2, p. 345-52. 1995.

MANNO, S.; TAKAKUWA, Y.; MOHANDAS, N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. **J Biol Chem**. v. 280, n.9, p. 7581. 2005.

MARCHESI, V. The red cell membrane skeleton: recent progress. **Blood**. v. 61, n.1, p. 1-11. 1983.

MARCHESI, V. T.; STEERS, E. Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. **Science**. v. 159, n.3811, p. 203-204. 1968.

MARIN, P. *et al.* Oxygen free radicals enhance the nitric oxide-induced covalent NAD⁺-linkage to neuronal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochemical Journal**. v. 309, n.3, p. 891-898. 1995.

MAYES, P. A.; BENDER, D. A. The Pentose Phosphate Pathway & Other Pathways of Hexose Metabolism. **a LANGE medical book**. v. p. 163. 2003.

MCDONALD, L. J.; MOSS, J. Stimulation by nitric oxide of an NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 90, n.13, p. 6238-6241. 1993.

MCLELLAN, A.; PHILLIPS, S.; THORNALLEY, P. The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1, 2-diamino-4, 5-dimethoxybenzene. **Anal Biochem**. v. 206, n.1, p. 17. 1992.

MCLELLAN, A. *et al.* Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. **Clinical science (London, England: 1979)**. v. 87, n.1, p. 21. 1994.

MEADE, S.; MILLER, A.; GERRARD, J. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study. **Bioorg Med Chem**. v. 11, n.6, p. 853. 2003.

MICHAELY, P.; BENNETT, V. The ANK repeats of erythrocyte ankyrin form two distinct but cooperative binding sites for the erythrocyte anion exchanger. **J Biol Chem**. v. 270, n.37, p. 22050. 1995.

MIWA, S. Hereditary disorders of red cell enzymes in the Embden-Meyerhof pathway. **American journal of hematology**. v. 14, n.4, p. 381. 1983.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**. v. 112, n.10, p. 3939-3948. 2008.

MORINO, K. *et al.* Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. **J Clin Invest**. v. 115, n.12, p. 3587. 2005.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, n.2, p. 168-178. 2007.

MURTHY, S. *et al.* The aldolase-binding site of the human erythrocyte membrane is at the NH2 terminus of band 3. **J Biol Chem**. v. 256, n.21, p. 11203. 1981.

NETTO, A. P. *et al.* Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA. **J Bras Patol Med Lab**. v. 45, n.1, p. 31-48. 2009.

NICOLAS, V. *et al.* Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. **J Biol Chem**. v. 278, n.28, p. 25526-33. 2003.

NIWA, T. *et al.* Presence of 3-deoxyglucosone, a potent protein crosslinking intermediate of Maillard reaction, in diabetic serum. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 196, n.2, p. 837. 1993.

OLIVIERI, E.; HERBERT, B.; RIGHETTI, P. The effect of protease inhibitors on the two-dimensional electrophoresis pattern of red blood cell membranes. **Electrophoresis**. v. 22, n.3, p. 560. 2001.

OLSEN, K. *et al.* Anion binding sites in the active center of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of molecular biology**. v. 107, n.4, p. 571-576. 1976a.

OLSEN, K. *et al.* Studies on coenzyme binding to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of molecular biology**. v. 107, n.4, p. 577-584. 1976b.

PARK, K.; SAUDEK, C.; HART, G. Increased expression of beta-N-acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes. **Diabetes**. v. 59, n.7, p. 1845. 2010.

PASINI, E. *et al.* In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. **Blood**. v. 108, n.3, p. 791. 2006.

PASINI, E. *et al.* Red blood cell (RBC) membrane proteomics--Part II: Comparative proteomics and RBC patho-physiology. **Journal of proteomics**. v. 73, n.3, p. 421. 2010b.

PASINI, E. M. *et al.* Red blood cell (RBC) membrane proteomics—Part I: Proteomics and RBC physiology. **Journal of proteomics**. v. 73, n.3, p. 403-420. 2010a.

PHILLIPS, S.; THORNALLEY, P. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. **European journal of biochemistry/FEBS**. v. 212, n.1, p. 101. 1993.

PRABHAKAR, P. K. PATHOPHYSIOLOGY OF SECONDARY COMPLICATIONS OF DIABETES MELLITUS. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v. 9, n.1, p. 32-36. 2016.

RALSER, M. *et al.* Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. **Journal of biology**. v. 6, n.4, p. 10. 2007.

REID, M. E.; MOHANDAS, N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. **Semin Hematol**. v. 41, n.2, p. 93-117. 2004.

REISZ, J. *et al.* Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells. **Blood**. v. 128, n.12, p. e32. 2016.

RINALDUCCI, S.; MARROCCO, C.; ZOLLA, L. Thiol-based regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in blood bank-stored red blood cells: a strategy to counteract oxidative stress. **Transfusion**. v. 55, n.3, p. 499. 2015.

ROBERTSON, R. P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. **Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n.41, p. 42351-42354. 2004.

ROGALSKI, A.; STECK, T.; WASEEM, A. Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the plasma membrane of the intact human red blood cell. **J Biol Chem.** v. 264, n.11, p. 6438. 1989.

SACKS, D. B. *et al.* Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin Chem.** v. 57, n.6, p. e1-e47. 2011.

SAKAI, K. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 300, n.1, p. 216. 2003.

SALOMAO, M. *et al.* Protein 4.1 R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 105, n.23, p. 8026. 2008.

SBD, S.-B.-D. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016. **AC FARMACÊUTICA LTDA.** v. p. 2016.

SCHALKWIJK, C.; STEHOUWER, C. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. **Clinical science (London, England: 1979).** v. 109, n.2, p. 143. 2005.

SENHAJI, N.; ELKHALFI, B.; SOUKRI, A. [Contribution to the study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in patients with type 2 diabetes]. **Pathol Biol (Paris).** v. 63, n.2, p. 74-9. 2015.

SHEETZ, M.; KING, G. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. **JAMA.** v. 288, n.20, p. 2579. 2002.

SHOTTON, D.; BURKE, B.; BRANTON, D. The shape of spectrin molecules from human erythrocyte membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure.** v. 536, n.1, p. 313-317. 1978.

SINGH, V. *et al.* Advanced glycation end products and diabetic complications. **The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology.** v. 18, n.1, p. 1. 2014.

SPEICHER, D. W.; MARCHESI, V. T. Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments. **Nature.** v. 311, n.5982, p. 177-80. 1984.

STECK, T. The band 3 protein of the human red cell membrane: a review. **Journal of supramolecular structure.** v. 8, n.3, p. 311. 1978.

STERLING, D.; REITHMEIER, R.; CASEY, J. A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. **J Biol Chem.** v. 276, n.51, p. 47886. 2001.

STITT, A. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. **Experimental and molecular pathology.** v. 75, n.1, p. 95. 2003.

STRAFACE, E. *et al.* Structural changes of the erythrocyte as a marker of non-insulin-dependent diabetes: protective effects of N-acetylcysteine. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 290, n.5, p. 1393. 2002.

STRATTON, I. *et al.* Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **BMJ (Clinical research ed.)**. v. 321, n.7258, p. 405. 2000.

TAKAKUWA, Y. *et al.* Restoration of normal membrane stability to unstable protein 4.1-deficient erythrocyte membranes by incorporation of purified protein 4.1. **Journal of Clinical Investigation.** v. 78, n.1, p. 80. 1986.

TARONE, G. *et al.* Proteolytic degradation of human erythrocyte band 3 by membrane-associated protease activity. **The Journal of membrane biology.** v. 48, n.1, p. 1. 1979.

THORPE, S.; BAYNES, J. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. **Amino acids.** v. 25, n.3-4, p. 275. 2003.

TRISTAN, C. *et al.* The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. **Cellular signalling.** v. 23, n.2, p. 317-323. 2011.

TSAI, I. H.; MURTHY, S. N.; STECK, T. L. Effect of red cell membrane binding on the catalytic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **J Biol Chem.** v. 257, n.3, p. 1438-42. 1982.

TSE, W. T.; LUX, S. E. Red blood cell membrane disorders. **Br J Haematol.** v. 104, n.1, p. 2-13. 1999.

TYLER, J. M.; HARGREAVES, W. R.; BRANTON, D. Purification of two spectrin-binding proteins: biochemical and electron microscopic evidence for site-specific reassociation between spectrin and bands 2.1 and 4.1. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 76, n.10, p. 5192-6. 1979.

TYLER, J. M.; REINHARDT, B. N.; BRANTON, D. Associations of erythrocyte membrane proteins. Binding of purified bands 2.1 and 4.1 to spectrin. **J Biol Chem.** v. 255, n.14, p. 7034-9. 1980.

UKPDS, U. K. P. D. S. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **The Lancet.** v. 352, n.9131, p. 837-853. 1998.

VAN DEN AKKER, E. *et al.* Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. **Blood cells, molecules & diseases.** v. 45, n.1, p. 1. 2010.

VAN DEURS, B.; BEHNKE, O. The microtubule marginal band of mammalian red blood cells. **Z Anat Entwicklungsgesch.** v. 143, n.1, p. 43. 1973.

VAN DORT, H. *et al.* Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane. **J Biol Chem.** v. 276, n.50, p. 46968. 2001.

VAN WIJK, R.; VAN SOLINGE, W. W. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. **Blood**. v. 106, n.13, p. 4034-4042. 2005.

VANDER JAGT, D. *et al.* Physiological substrates of human aldose and aldehyde reductases. **Advances in experimental medicine and biology**. v. 414, p. 491. 1997.

VISTOLI, G. *et al.* Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radic Res**. v. 47, p. 3. 2013.

WANG, M. *et al.* Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in multiple insulin-sensitive tissues of humans with type 2 diabetes mellitus. **J Int Med Res**. v. 38, n.3, p. 769. 2010.

WANG, Z. *et al.* Site-specific GlcNAcylation of human erythrocyte proteins: potential biomarker (s) for diabetes. **Diabetes**. v. 58, n.2, p. 309. 2009.

WEI, M. *et al.* Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality: the San Antonio Heart Study. **Diabetes Care**. v. 21, n.7, p. 1167-1172. 1998.

WEINSTEIN, R. S.; SURGENOR, D. M. N. The morphology of adult red cells. In. **The red blood cell**, 1974. p.213.

WELLS-KNECHT, K. *et al.* Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. **Biochemistry**. v. 34, n.11, p. 3702. 1995.

WOLFF, S.; DEAN, R. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. **Biochem J**. v. 245, n.1, p. 243. 1987.

YAMADA, H. *et al.* Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma. Specific in vivo determination of intermediate in advanced Maillard reaction. **J Biol Chem**. v. 269, n.32, p. 20275. 1994.

YATES, J.; RUSE, C.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual review of biomedical engineering**. v. 11, p. 49. 2009.

YI, S. *et al.* Red cell membranes of ankyrin-deficient nb/nb mice lack band 3 tetramers but contain normal membrane skeletons. **Biochemistry**. v. 36, n.31, p. 9596. 1997.

YOON, J.; JUN, H. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. **Ann N Y Acad Sci**. v. 928, p. 200. 2001.

YU, J.; FISCHMAN, D.; STECK, T. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. **Journal of supramolecular structure**. v. 1, n.3, p. 233. 1973.

YU, J.; STECK, T. L. Isolation and characterization of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. **J Biol Chem**. v. 250, n.23, p. 9170-5. 1975.

ZHANG, Q. *et al.* Comprehensive identification of glycated peptides and their glycation motifs in plasma and erythrocytes of control and diabetic subjects. **J Proteome Res.** v. 10, n.7, p. 3076-88. 2011.

ZHANG, Q. *et al.* Proteomic profiling of nonenzymatically glycated proteins in human plasma and erythrocyte membranes. **J Proteome Res.** v. 7, n.5, p. 2025-32. 2008.

ZHANG, Y. *et al.* Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. **Chemical reviews.** v. 113, n.4, p. 2343. 2013.

ZHU, D.; BOURGUIGNON, L. Interaction between CD44 and the repeat domain of ankyrin promotes hyaluronic acid-mediated ovarian tumor cell migration. **J Cell Physiol.** v. 183, n.2, p. 182. 2000.

ANEXO 1 – ANÁLISE PROTEÔMICA

PROTEÍNAS DA MEMBRANA DO ERITRÓCITO IDENTIFICADA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF.

BANDA IDENTIFICADA	PROTEÍNA IDENTIFICADA	Nº DE ACESSO	SCORE ^a	CS (%) ^b	NMP ^c	MM (kDa)/pI TEÓRICA	ERRO (ppm)
A	Espectrina (beta)	EAW80880.1	152	14	29/21	242582	100
	Espectrina (alfa)	EAW52817.1	90	9	37/21	281141	100
B	Banda 3	XP_005257650.1	204	26	25/18	94135	100
C	Anquirina	CAA34611.1	117	17	39/19	188894	100
	Banda 3	XP_005257650.1	69	17	39/11	94135	100
D	Proteína 4.2	AAH99627.1	192	25	28/17	69412	100
E	Banda 3	XP_011523431.1	105	16	27/13	98278	100
F	Banda 3	XP_005257650.1	127	17	23/12	94135	65
G	Actina	AAH08633.1	140	34	27/11	40978	100
H	Proteína 4.1	XP_016856093.1	72	16	19/07	59289	100
	Banda 3	XP_005257650.1	82	15	15/08	94135	160
I	Proteína 4.1	XP_016856093.1	73	16	14/07	59289	100
	Banda 3	XP_005257650.1	77	15	21/09	94135	100
J	G3PDH	CAA25833.1	93	37	33/11	36030	70
	Banda 3	XP_011523432.1	73	17	31/10	87593	100
K	G3PDH	CAA25833.1	93	37	33/11	36030	100
	Banda 3	XP_011523432.1	117	18	18/11	87593	100
L	Banda 7/ Estomatina	EQB78920.1	176	57	15/12	23058	50

^aO score representa a pontuação obtida na correspondência com a base de dados NCBI^{nr} pelo software MASCOT

^bCobertura de sequências

^cNúmero de peptídeos correspondente

